

Caroline Luiz

**EFEITO DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO (*Xanthomonas
gardneri*) E DA PODRIDÃO NEGRA DA COUVE-
FLOR (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Grau de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo
Di Piero

**Florianópolis, SC
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Luiz, Caroline

EFEITO DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA MANCHA
BACTERIANA DO TOMATEIRO (*Xanthomonas gardneri*) E DA
PODRIDÃO NEGRA DA COUVE- FLOR (*Xanthomonas campestris* pv.
campestris) [dissertação] / Caroline Luiz ; orientador,
Robson Marcelo Di Piero - Florianópolis, SC, 2013.

145 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Mancha bacteriana .
3. Controle alternativo. 4. Indução de resistência . 5.
Polissacarídeos. I. Di Piero , Robson Marcelo . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Caroline Luiz

**EFEITO DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO (*Xanthomonas
gardneri*) E DA PODRIDÃO NEGRA DA COUVE-
FLOR (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2013.

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Robson Marcelo Di Piero, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marciel João Stadnik, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Márcio José Rossi, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Pesquisador Nelson Arno Wulff,
Dr.
Departamento Científico
do Fundecitrus

Prof.^a Rosete Pescador, Dr.^a
Universidade Federal de Santa
Catarina

À minha família, meu porto seguro, minha vida...

Aos meus pais Nilson e Márcia, pela dedicação, amizade e amor incondicional;

Aos meus irmãos Gabriel e André, meus exemplos, minha vida;

À Giovana, por ter colocado neste mundo o ser mais iluminado, Maria Eduarda;

Ao meu querido companheiro Ricardo Pimenta, pela paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelo conhecimento repassado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

Ao professor Dr. Robson Marcelo Di Piero, pela sua grande dedicação, paciência e orientação em todas as etapas do meu trabalho;

Aos professores Dr. Marciel Stadnik, Dr^a Rosete Pescador e Dr. Márcio José Rossi e ao pesquisador Dr. Nelson Arno Wulff, que gentilmente aceitaram participar da banca examinadora;

Ao senhor Dionizio, da empresa Naturama suco integrais[®], por fornecer as babosas utilizadas no estudo;

Aos meus queridos pais, por tudo que eu sou, pela dedicação, pelo amor incondicional, por serem pais exemplares, companheiros e, principalmente, amigos. Obrigada mãe, por pacientemente me aguentar durante essa fase e por me auxiliar em todos os momentos. Obrigada pai, por me ajudar a montar sombrites, molhar plantinhas, ir atrás de substratos, doar materiais, etc.

Ao meu querido “marido” Ricardo Pimenta, por toda a paciência do mundo, pelo seu amor, carinho, pela sua dedicação, por ter aceitado fazer parte da família que escolhi;

Aos amigos Ricardo, Argus, Zamira, Aline, Mateus, Amanda, Catarina, Máira, Josiane, Nathalie, Carmem, Tarsis, Giana, Elaine, Cezar, Alessandro, Carol e Naiana por estarem sempre disponíveis para ajudar e, principalmente, pela amizade;

À minha amiga Paulinha, pela amizade valiosa, por estar sempre ao meu lado e por me ajudar em todos os passos da dissertação, aconselhando, corrigindo, etc.;

À minha amiga Daniela, pela amizade, por ser uma pessoa admirável e digna de inspiração. Me espelho muito em você, Dani!

Às minhas “gurias”, amores da minha vida, Carol, Fê, Lú, Karla, Marila e Mari, que me proporcionam momentos maravilhosos de divertimento, que doam espontaneamente os seus ombros e ouvidos quando preciso.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

LUIZ, C. Efeito de polissacarídeos no controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas gardneri*) e da podridão negra da couve-flor (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). Florianópolis; 2013. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFSC].

A mancha-bacteriana e a podridão negra são doenças de grande importância em plantações de tomate e couve-flor, respectivamente. A produtividade das plantas atacadas por estas moléstias é comprometida principalmente pela redução da área foliar. A aplicação de polissacarídeos de plantas e microrganismos sobre culturas vegetais pode representar uma eficiente forma de controle alternativo de doenças. Este trabalho objetivou avaliar o efeito da goma xantana (GOMA) e de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) e do parênquima de reserva da babosa (PB) na proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana e na proteção de plantas de couve-flor contra a podridão negra. A redução da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com PB ou GOMA foi da ordem de 83,80 %. A severidade em tomateiros tratados com PX mostrou-se, em média, 59,1 % menor que a das plantas testemunhas. Em couve-flor, todas as doses de PB testadas foram eficientes no controle da doença, reduzindo em média 69,0 % da severidade em relação à testemunha. A GOMA foi capaz de reduzir a podridão negra apenas nas menores doses, diminuindo aproximadamente 66,4 %. Em média, PX foi capaz de reduzir a severidade da podridão negra em 77,8 % em relação às plantas tratadas com água destilada. A uma temperatura média de 26 °C, no interior de uma casa de vegetação, observou-se que todas as suspensões polissacarídicas testadas foram capazes de controlar a mancha bacteriana do tomateiro quando aplicadas 2 ou 4 dias antes da inoculação com o patógeno. Porém, a 19 °C, PB, GOMA e PX controlaram a doença mesmo quando aplicados em um intervalo de tempo maior (6 dias antes da inoculação). PB e GOMA não promoveram uma redução significativa do crescimento *in vitro* das colônias de *X. gardneri* e *X. campestris* pv. *campestris* em todas as doses testadas. A maior concentração de PX conferiu uma redução de 56,0 % sobre o crescimento bacteriano de *X. gardneri* e chegou a diminuir 97,6 % do crescimento da *X. campestris* pv. *campestris* em relação à testemunha. PB, GOMA e PX promoveram acúmulo de peróxido de hidrogênio em

células foliares de tomateiro, porém o mesmo não foi observado em couve-flor. Sob temperaturas mais elevadas (24,5 °C), observou-se que, 4 dias após a pulverização dos tomateiros, as plantas tratadas com PB, GOMA ou PX apresentavam atividade de peroxidase 3, 4,2 e 4,1 vezes maiores que a da testemunha, respectivamente. No sexto dia, a atividade de peroxidases em plantas tratadas com polissacarídeos manteve a mesma tendência. Resultados semelhantes foram observados neste mesmo período em tomateiros tratados com ASM. A atividade de polifenoloxidasas foi aumentada apenas nos vegetais pulverizados com PB e ASM. Além da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, também foi avaliado o acúmulo de compostos fenólicos totais e flavonóides em folhas de tomateiro tratadas com diferentes polissacarídeos e inoculadas 4 dias após a pulverização dos mesmos, sob uma temperatura média de 24,5 °C. As suspensões polissacarídicas não influenciaram no conteúdo de compostos fenólicos totais em folhas de tomateiro. Porém, foi evidenciado um aumento sutil no teor de flavonóides em plantas tratadas com PB após a inoculação do patógeno. Além do aumento da atividade enzimática ser evidenciado em tomateiros cultivados sob altas temperaturas, também observou-se um incremento da atividade de enzimas (peroxidases, polifenoloxidasas e FAL) em plantas cultivadas em casa de vegetação, sob uma temperatura média de 19,2 °C, e tratadas com PB, GOMA ou PX. Em couve-flor pulverizada com os polissacarídeos não foi observada uma alteração da atividade de polifenoloxidasas. Contudo, verificou-se que após 2 e 4 dias da aplicação dos tratamentos, a GOMA e PX elevaram significativamente a atividade de peroxidases. Os resultados do presente estudo mostram a capacidade de PB, GOMA e PX em ativar mecanismos de defesa do tomateiro e da couve-flor e, consequentemente, de controlar doenças como a mancha bacteriana e a podridão negra.

Palavras-chave: Mancha bacteriana. Controle alternativo. Indução de resistência. Proteínas relacionadas à patogênese. Polissacarídeos. Babosa. Goma xantana.

ABSTRACT

LUIZ, C. **Effect of polysaccharides in controlling bacterial spot of tomato (*Xanthomonas gardneri*) and black rot of cauliflower (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)**. Florianópolis, 2013. [Dissertation – Post graduate Program in Plant Genetic Resources UFSC].

The bacterial spot and black rot are diseases of major importance in tomato and cauliflower crops, respectively. The productivity of plants infected by these diseases is affected especially by reduced leaf area. The application of plant polysaccharides and microorganisms on crops may represent an efficient way of controlling these diseases. This study evaluated the effect of xanthan gum (GOMA) and polysaccharides extracted from *Xanthomonas gardneri* (PX) and from aloe reserve parenchyma (PB) to protect the tomato plant against bacterial spot as well as the cauliflower against the black rot. The reduction of bacterial spot severity in the tomato plants treated with PB or GOMA was around 83.80 % and when treated with PX was, on average, 59.1 % lower than the control plant. In cauliflower, all the tested PB's doses were effective in disease control, reducing, on average, 69.0 % of severity compared to the control plants. The GOMA reduced the black rot only at lower doses, decreasing approximately 66.4 %. On average, doses of PX, reduced the severity of black rot in 77.8 % compared to plants treated with water. At a temperature of 26 °C, it was observed that all the tested polysaccharide suspensions were able to control the bacterial spot of tomato plants when applied 2 or 4 days before inoculation with the pathogen. However, at 19 °C, PB, GOMA and PX controlled the disease even when applied in a longer interval (6 days prior to inoculation). PB and GOMA did not provoke a significant growing reduction of *in vitro* colonies of *X. gardneri* and *X. campestris* pv. *campestris* in all tested doses. A higher PX concentration reduced 56.0 % of *X. gardneri* and decreased 97.6 % of *X. campestris* pv. *campestris* bacterial growth in relation to the control. PB, PX and GOMA promoted accumulation of hydrogen peroxide in tomato leaf cells, but the same was not observed in cauliflower. Under higher temperature (24.5 °C), it was observed that, 4 days after the application on tomato plants, those treated with PB, PX or GOMA showed peroxidase activity 3, 4.2 and 4.1 times higher than the control plant, respectively. On the sixth day, the peroxidase activity in plants treated with polysaccharides kept the same tendency. Similar

results were observed at the same period in plants treated with ASM. The activity of polyphenol oxidases was increased only in plants sprayed with PB and ASM. It was also evaluated the accumulation of total phenolic compounds and flavonoids in tomato leaves treated with different polysaccharides and inoculated 4 days after spraying under an average temperature of 24.5°C. The polysaccharide suspensions did not influence the content of total phenolic compounds in tomato leaves, however, it was observed a slight increase in flavonoid content in plants treated with PB after pathogen inoculation. Besides the increase of enzyme activity was evidenced in tomato plant grown under high temperatures it was also observed an increase in the activity of enzymes (peroxidases, polyphenol oxidases and FAL) in plants grown in a greenhouse under an average temperature of 19.2 °C and treated with PB, GOMA or PX. In cauliflower plants sprayed with the polysaccharides it was not observed any change in the activity of polyphenol oxidases, however, it was verified that 2 and 4 days after application of treatments, GOMA and PX, the activity of peroxidases increased significantly. The results of the present study demonstrate the capacity of PB, GOMA and PX in activating latent defense mechanisms of tomato and cauliflower plants to control diseases such as black rot and bacterial spot.

Keywords: Bacterial spot. Alternative control. Induction of resistance. Pathogenesis-related proteins. Polysaccharides. Aloe. Xanthan gum.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamento com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação com *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm) sobre a severidade (%) da mancha bacteriana. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,67 %..... 70

TABELA 2. Efeito de concentrações (0; 0,5; 0,75; 1,5; 3,0 mg.ml⁻¹) de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) e polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) sobre o crescimento *in vitro* da *Xanthomonas gardneri*.71

TABELA 3. Número de células com reação de hipersensibilidade ou com acúmulo de peróxido de hidrogênio/cm² no mesofilo e na epiderme foliar de plantas de tomate tratadas com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e inoculadas com *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm). 74

TABELA 4. Efeito do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de tomateiros com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação das plantas com *Xanthomonas gardneri* sobre a atividade de peroxidases (DO 470 nm.mg proteína⁻¹.min⁻¹). Os dados foram transformados em raiz quadrada. 79

TABELA 5. Efeito do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de tomateiros com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação das plantas com *Xanthomonas gardneri* sobre a atividade de polifenoloxidasas (DO 420 nm.mg proteína⁻¹.min⁻¹). Os dados foram transformados em raiz quadrada 80

TABELA 6. Efeito do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de tomateiros com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação das plantas com *Xanthomonas gardneri* sobre a atividade de fenilalanina amônia-liases (nmol ácido trans-cinâmico mg proteína⁻¹ min⁻¹). 81

TABELA 7. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamento com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação com *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm) sobre a severidade (%) da mancha bacteriana. 82

TABELA 8. Efeito de concentrações (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg.ml⁻¹) de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) e polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) sobre o crescimento *in vitro* da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 106

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Sintomas da mancha bacteriana (<i>Xanthomonas gardneri</i>) em folhas de tomateiro.	39
FIGURA 2. Sintomas da podridão negra (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>) em folhas de couve-flor.	42
FIGURA 3. Severidade da mancha bacteriana (<i>Xanthomonas gardneri</i>) em plantas de tomate tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB) (0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 mg.ml ⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação, em dois experimentos independentes (a e b). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p <0,05). * Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %.....	65
FIGURA 4. Severidade da mancha bacteriana (<i>Xanthomonas gardneri</i>) em plantas de tomate tratadas com concentrações do parênquima de reserva da babosa (GEL) (0; 10; 20; 30; 40 %). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação. Não foi observado um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p <0,05). Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %	66
FIGURA 5. Severidade da mancha bacteriana (<i>xanthomonas gardneri</i>) em plantas de tomate tratadas com concentrações de goma xantana (GOMA) (0; 0,25; 0,75; 1,5; 3,0 mg.ml ⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas de tomate 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação, em dois experimentos independentes (a e b). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p <0,05). *Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %	67
FIGURA 6. Severidade da mancha bacteriana (<i>Xanthomonas gardneri</i>) em plantas de tomate tratadas com concentrações de polissacarídeos	

extraídos da *X. gardneri* (PX) (0;0,5; 0,75; 1,5; 3,0; 3,5 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação, em dois experimentos independentes (a e b). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F ($p < 0,05$). *Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %.
..... 69

FIGURA 7. Efeito de concentrações de polissacarídeos extraídos *X. gardneri* (PX) sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas gardneri*. *Significativo a 5 % de probabilidade. 71

FIGURA 8. Células foliares de tomateiro, 24h após a inoculação com *X. gardneri*: células do mesofilo de plantas de tomate tratadas com água destilada (A), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB a 1,5 mg.ml⁻¹ (B) ou goma xantana - GOMA a 1,5 mg.ml⁻¹ (C); acúmulo de peróxido de hidrogênio foi observado em (B) e (C). Células epidérmicas de tomateiro, tratado com polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (1,5 mg.ml⁻¹), apresentando reação de hipersensibilidade (D). Barras = 10μM..... 73

FIGURA 9. Atividade de peroxidases em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■; $y = 0,33x^* + 0,54$; $r^2 = 0,76$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa – PB (▲; $y = 1,0489x^* + 0,70$; $R^2 = 0,92$), goma xantana - GOMA (●; $y = 1,0x^* + 0,61$; $R^2 = 0,98$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* – PX (×; $y = 0,88x^* + 0,71$; $R^2 = 0,95$) ou acibenzolar-s-metil - ASM (◆; $y = 1,48x^* + 0,13$; $R^2 = 0,96$). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. *Significativo a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$). 75

FIGURA 10. Atividade de polifenoloxidasas em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■; $y = 0,01x^* + 0,07$; $R^2 = 0,89$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa – PB (▲; $y = 0,03x^* + 0,05$; $R^2 = 0,91$), goma xantana – GOMA (●; $y = 0,026x^* + 0,07$; $R^2 = 0,94$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (×; $y =$

0,03x* + 0,07; $R^2=0,95$) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆; $y=0,05x^* + 0,09$; $R^2=0,91$). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. *Significativo a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$)..... 76

FIGURA 11. Conteúdo de compostos fenólicos em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲), goma xantana – GOMA (●); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (×) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Resultados não significativos a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$). 77

FIGURA 12. Conteúdo de flavonóides em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■; $y = 18,56x^* + 103,29$; $R^2 = 0,98$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲; $y = 24,22x^* + 98,14$; $R^2 = 0,96$), goma xantana – GOMA (●; $y = 20,63x^* + 77,84$; $R^2 = 0,68$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* – px (×; $16,96x^* + 86,80$; $R^2 = 0,76$) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆; $y = 32,22x^* + 111,29$; $R^2 = 0,99$). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. *Significativos a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$). 78

FIGURA 13. Severidade da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲ - 0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 mg.ml⁻¹) e de goma xantana - GOMA (● - 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,5 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 14 dias após a inoculação. Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F ($p < 0,05$). *Significativo a 5 % de probabilidade.

Severidade média em plantas tratadas com acibenzolar-s-metil (ASM) = 3,0 % 103

FIGURA 14. Severidade da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos de *Xanthomonas gardneri* – PX (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 14 dias após a inoculação. Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p <0,05). *Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com acibenzolar-s-metil (ASM) = 3,9 % 104

FIGURA 15. Severidade da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em plantas de couve-flor tratadas com polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (1,5 mg.ml⁻¹), com goma xantana - GOMA (0,5 mg.ml⁻¹) e com polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* – PX (0,5 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 14 dias após a inoculação. Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey..... 105

FIGURA 16. Efeito de concentrações de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* – PX (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg.ml⁻¹) sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Foi observado efeito de dose dependente de acordo com o teste F (p <0,05). *Significativo a 5 % de probabilidade. 106

FIGURA 17. Atividade de peroxidases em folhas de couve-flor tratadas com água destilada (■; $y = -0,138x^2 + 0,88x + 2,68$; $R^2 = 0,94$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲; $y = -0,14x^2 + 1,053x + 2,55$; $R^2 = 0,96$), goma xantana - GOMA (●; $y = -1,07x^2 + 6,69x + 2,19$; $R^2 = 0,95$), polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* – PX (×; $y = -0,57x^2 + 3,56x + 2,2$; $R^2 = 0,86$) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆; $y = 0,375x^2 + 2,31x + 2,01$; $R^2 = 0,55$). O símbolo “Xc” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. *Significativo a 5 % de probabilidade de

acordo com o teste F ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey. 107

FIGURA 18. Atividade de polifenoloxidasas em folhas de couve-flor tratadas com água destilada (■), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa – PB (▲), goma xantana – GOMA (●; polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* – PX ($y = 0,03x^* + 0,07$; $R^2 = 0,95$) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆). O símbolo “Xc” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. O teste F ($p < 0,05$) não foi significativo a 5 % de probabilidade. 108

LISTA DE SIGLAS

ASM	Acibenzolar-S-metil
BDA	Batata-dextrose-ágar
CBB	<i>Coomassie brilliant blue</i>
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAL	Fenilalanina amônia-liase
GOMA	goma xantana
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NA	Nutriente Agar
PB	Polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PRPs	Proteínas Relacionadas à Patogênese
PVP	Polivinilpirrolidona
PX	Polissacarídeos extraídos da <i>Xanthomonas gardneri</i>
Xg	<i>Xanthomonas gardneri</i>

SUMÁRIO EXECUTIVO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma planta originária da América do Sul, mais especificamente de regiões entre o Equador e o norte do Chile, desde o litoral até determinadas altitudes das Cordilheiras dos Andes. A couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), variedade botânica descendente da couve-silvestre (*B. oleracea* var. *silvestris*), é uma espécie hortícola pertencente à família Brassicaceae, anteriormente denominada Cruciferae. Tanto a couve-flor, como o tomate, possuem grande importância para os agricultores familiares que, normalmente, cultivam estas espécies em pequenas áreas ao longo do ano. Porém, mesmo adaptadas às condições edafoclimáticas das regiões produtoras, o desenvolvimento e a produtividade da couve-flor e do tomate podem ser prejudicados pela ocorrência de doenças, dentre as quais destacam-se a podridão negra e a mancha bacteriana, respectivamente. O método químico pode ser utilizado para o controle destas doenças, no entanto, muitas vezes, é efetuado de maneira não racionalizada e pode levar ao aumento do custo de produção, ao favorecimento da seleção de raças resistentes aos produtos aplicados, etc. Devido a este fato, tem-se buscado métodos alternativos ao controle convencional de doenças. A utilização de polissacarídeos no controle de doenças é uma alternativa ao controle convencional de fitomoléstias, pois os mesmos, além de serem abundantes e prontamente disponíveis, são obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e culturas microbianas. Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito de polissacarídeos, como a goma xantana e aqueles extraídos da *Xanthomonas gardneri* e do parênquima de reserva da babosa, na proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana e na proteção de plantas de couve-flor contra a podridão negra. Com isso, espera-se contribuir para a descoberta de novos métodos de controle de doenças de plantas, que visem à conservação do meio ambiente e à produção de alimentos livres de agrotóxicos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE SIGLAS	XXIII
SUMÁRIO EXECUTIVO	XXV
INTRODUÇÃO GERAL	29
OBJETIVOS	31
OBJETIVO GERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
HIPÓTESE	33
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PATOSSISTEMAS E A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	35
1.1 A CULTURA DO TOMATEIRO	35
1.1.1 Características botânicas e histórico do tomateiro	35
1.1.2 Importância econômica e nutricional do tomateiro	36
1.1.3 Mancha bacteriana.....	37
1.2 A CULTURA DA COUVE-FLOR	39
1.2.1 Características botânicas e histórico da couve-flor	39
1.2.2 Importância econômica e nutricional da couve-flor	40
1.2.3 Podridão negra.....	41
1.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	43
1.3.1 Conceitos e definições.....	43
1.3.2 Mecanismos de defesa.....	45
1.4 A UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E DA BABOSA NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS	48
CAPÍTULO 2 – POTENCIAL DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO	53
2.1 INTRODUÇÃO	53
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.2.1 Condições de cultivo do tomateiro e obtenção do isolado de <i>Xanthomonas gardneri</i>	55
2.2.2 Extração dos polissacarídeos.....	56
2.2.3 Obtenção da goma xantana comercial e do ASM.....	57
2.2.4 Avaliação da severidade da mancha bacteriana do tomateiro	57
2.2.5 Efeito antimicrobiano de polissacarídeos sobre a <i>X. gardneri</i>	59
2.2.6 Reação de hipersensibilidade	60
2.2.7 Análises bioquímicas realizadas com plantas de tomate	61

2.3 RESULTADOS.....	64
2.3.1 Efeito de polissacarídeos sobre a severidade da mancha bacteriana do tomateiro	64
2.3.2 Efeito de polissacarídeos sobre o crescimento in vitro de <i>X. gardneri</i>	70
2.3.3 Reação de hipersensibilidade em plantas de tomate tratadas com diferentes polissacarídeos e inoculados com <i>X. gardneri</i>	72
2.3.4 Análises bioquímicas realizadas com plantas de tomate.....	74
2.4 DISCUSSÃO	82
CAPÍTULO 3 – POTENCIAL DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA PODRIDÃO NEGRA DA COUVE-FLOR	95
3.1 INTRODUÇÃO	95
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	96
3.2.1 Condições de cultivo e obtenção do isolado	96
3.2.2 Extração dos polissacarídeos	97
3.2.3 Obtenção da goma xantana e do ASM.....	98
3.2.4 Aplicação dos tratamentos, inoculação e avaliação da severidade da doença	98
3.2.5 Efeito antimicrobiano.....	99
3.2.6 Reação de hipersensibilidade e atividade de peroxidases e polifenoloxidasas	100
3.3 RESULTADOS.....	101
3.3.1 Efeito de polissacarídeos sobre a severidade da podridão negra em couve-flor.....	101
3.3.2 Atividade antimicrobiana de polissacarídeos sobre a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	105
3.3.3 Reação de hipersensibilidade e atividade de peroxidases e polifenoloxidasas	106
3.4 DISCUSSÃO	108
4 CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO.....	137

INTRODUÇÃO GERAL

As hortaliças são, por excelência, fontes de vitaminas e sais minerais, de grande importância para a alimentação humana. Dentre as plantas hortícolas mais consumidas e produzidas no mundo estão o tomateiro e as brássicas, como a couve-flor, que assumem um papel relevante na agricultura familiar.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta originária da América do Sul, mais especificamente de regiões entre o Equador e o norte do Chile, desde o litoral até determinadas altitudes das Cordilheiras dos Andes. Devido ao seu histórico de origem, pode-se afirmar que esta planta, tropical de altitude, além de adaptar-se a quase todos os tipos de clima existentes, é acometida por diversas doenças que podem causar grande redução da produtividade e qualidade do tomate.

A couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.), variedade botânica descendente da couve-silvestre (*B. oleracea* var. *silvestris*), tem uma importância relevante na horticultura mundial, principalmente para os agricultores familiares, devido ao volume produzido e também ao valor nutricional das culturas. Porém, mesmo adaptada às condições edafo-climáticas das regiões produtoras, o desenvolvimento e a produtividade da couve-flor podem ser prejudicados pela ocorrência de fitopatógenos.

Dentre os fatores bióticos envolvidos na diminuição da produção, as doenças causadas por fitobactérias assumem papel de destaque. Diversos gêneros, espécies, subespécies e patovares de bactérias fitopatogênicas são responsáveis por doenças na cultura do tomateiro e da couve-flor, como, por exemplo, a mancha-bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e a podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), respectivamente (LOPES; STRIPARI, 1998; MALAVOLTA JUNIOR, 2004).

Devido à alta suscetibilidade do tomateiro e das brássicas a doenças, principalmente a bactérias do gênero *Xanthomonas*, é comum a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos em lavouras. Esta aplicação indiscriminada de produtos químicos, por sua vez, além de aumentar o custo de produção, pode causar impactos ambientais, danos aos seres vivos e favorecer a seleção de raças resistentes aos ingredientes ativos. De acordo com Janisiewicz (1996), Campanhola e Bettiol (2003), a produção de alimentos livres de resíduos tóxicos tem sido enfatizada nos últimos anos. Por isso, pesquisas vêm sendo realizadas para a obtenção de métodos alternativos de controle a fitopatógenos, como a indução de resistência dos vegetais, que é a

ativação de mecanismos de defesa através de moléculas elicitoras, como, por exemplo, os polissacarídeos.

Os polissacarídeos, além de serem precursores na elicitação de mecanismos de defesa de plantas, são abundantes, estão prontamente disponíveis e são obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e culturas microbianas. Por isso, a sua utilização na agricultura, para a redução de doenças vegetais, pode ser considerada uma alternativa ao controle convencional de fitopatógenos.

A goma xantana, exopolissacarídeo presente na cápsula da bactéria *Xanthomonas campestris*, é um dos polissacarídeos que têm demonstrado eficiência no controle de doenças de plantas. Como por exemplo, Bach, Barros e Kimati (2003), ao aplicarem a goma xantana ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) em plantas de trigo contra *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana*, e *Drechslera tritici-repentis*, observaram reduções na severidade das doenças na ordem de 97,2 %, 95,2 % e 96,5 %, respectivamente. Em contrapartida, outros estudos vêm comprovando que o exopolissacarídeo capsular de algumas bactérias possui função de toxina, provocando sintomas da doença na ausência de células vivas do microrganismo (ROMEIRO, 2005).

Além da goma xantana, outros polissacarídeos têm sido extraídos, tanto de microrganismos como de vegetais, para a utilização na prevenção de doenças. A babosa (*Aloe barbadensis* M.), por exemplo, possui diversos compostos com eficiência na prevenção de doenças de plantas e um parênquima de reserva mucilaginoso constituído majoritariamente por polissacarídeos, dentre esses a acemanana, principal substância ativa da planta. Este polissacarídeo, por sua vez, é muito estudado quanto a sua atividade no organismo humano, porém pouco se encontra a respeito do seu efeito no metabolismo vegetal (ROVATTI; BRENNAN, 1959; FEMENIA et al., 1999; REYNOLDS; DWECK, 1999; SURJUSHE; VASANI; SAPLE, 2008; CARPANO; CASTRO; SPEGAZZINI, 2009).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da goma xantana comercial e de polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* e do parênquima de reserva da babosa para o controle da mancha bacteriana do tomateiro e da podridão negra em couve-flor, bem como avaliar o potencial elicitor e antimicrobiano destes polissacarídeos. O trabalho está organizado em três capítulos, compreendendo um capítulo teórico e dois experimentais.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da goma xantana e de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* e do parênquima de reserva da babosa na proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana e na proteção de plantas de couve-flor contra a podridão negra.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de doses de diferentes polissacarídeos (polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa, goma xantana e polissacarídeos extraídos da *X. gardneri*) sobre a severidade da mancha bacteriana do tomateiro e sobre a severidade da podridão negra da couve-flor;
- observar a influência do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação de plantas de tomate sobre a severidade das manchas bacterianas;
- verificar o efeito de diferentes concentrações da goma xantana e de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* e do parênquima de reserva da babosa sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas gardneri* e de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*;
- avaliar a reação de hipersensibilidade em plantas de tomate e de couve-flor tratadas com polissacarídeos e inoculadas;
- determinar a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas em plantas de couve-flor tratadas com diferentes polissacarídeos e inoculadas com *X. campestris* pv. *campestris* e determinar as atividades de peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liase, compostos fenólicos totais e flavonóides em plantas de tomate tratadas com diferentes polissacarídeos e inoculadas com *X. gardneri*.

HIPÓTESE

A goma xantana e os polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa e da *Xanthomonas gardneri* reduzem a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate e de couve-flor e são capazes de ativar seus mecanismos de defesa.

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PATOSSISTEMAS E A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

1.1 A CULTURA DO TOMATEIRO

1.1.1 Características botânicas e histórico do tomateiro

O tomateiro, dicotiledônea pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum*, é um vegetal do tipo perene, cultivado como anual, de porte arbustivo e raiz pivotante. Suas flores são hermafroditas, pequenas e amareladas, seus frutos são carnosos, com formato globular a alongado, com dois a doze lóculos, e suas sementes são pequenas e reniformes (JARUATA; FANTOVA, 1999; MINAMI; HAAG, 1989). As folhas desta planta são alternadas, compostas, com um grande folíolo terminal e cerca de seis a oito folíolos laterais que podem, por sua vez, ser compostos. Seu caule é redondo, piloso e macio quando jovem e anguloso e fibroso quando mais velhos. Este vegetal pode desenvolver-se de forma rasteira, semiereta ou ereta, em condições climáticas bastante variáveis (FONTES; SILVA, 2002; ALVARENGA, 2004).

Mesmo não tolerando o frio e nem o calor excessivo, a cultura em questão pode desenvolver-se em climas do tipo tropical de altitude, subtropical e temperado, permitindo seu cultivo em diversas regiões do mundo. Esta característica é devido ao seu centro de origem, pois o mesmo abrange regiões desde o nível do mar até elevadas altitudes (MINAMI; HAAG, 1989).

O tomateiro é uma planta originária da América do Sul, mais especificamente de regiões entre o Equador e o norte do Chile, desde o litoral até uma altitude de 2.000 m da região Andina. Espécies deste vegetal foram levadas pelos Incas até a região onde os astecas habitavam, o sul do México, que tornou-se o país centro de domesticação do tomate cultivado, em especial na região de Puebla e Vera Cruz (JENKINS, 1948; RICK, 1967; CAMARGO, 1992; PAZINATO; GALHARDO, 1997).

Na época do descobrimento da América, na chegada dos espanhóis, a cultura do tomateiro já estava amplamente difundida na América Central e na América do Sul. No século XVI, encantados com o fruto, os espanhóis levaram o tomateiro para o Sul da Europa e, lentamente, o cultivo desta planta foi se disseminando para o Norte do continente. Apesar do tomate ser levado pelos espanhóis para a Europa, foram os povos do sul da Itália e da Turquia os primeiros a utilizá-lo na alimentação, mas seu consumo foi difundido e ampliado somente no

século XIX, pois havia crença de que tomate era venenoso. No Brasil, o tomate foi introduzido pelos portugueses e espanhóis no século XIX e o seu consumo foi disseminado principalmente após a Primeira Guerra Mundial (PAZINATO; GALHARDO, 1997; MINAMI; HAAG, 1989; NAIKA et al., 2006).

O surgimento do tomate Santa Cruz no Brasil, no estado do Rio de Janeiro, nos anos 40, foi um marco na trajetória da comercialização e consumo deste fruto no país. Acredita-se que esta cultivar teria surgido como híbrido natural entre Umberto e Redondo Japonês em Suzano, no estado de São Paulo. Esse, por sua vez, obteve uma boa aceitação no mercado do Rio de Janeiro, a partir de então o híbrido foi difundido para os outros estados brasileiros (LOPES; STRIPARI, 1998; ALVARENGA, 2004).

1.1.2 Importância econômica e nutricional do tomateiro

A cultura do tomateiro assume grande importância econômica, representando o tomate um dos produtos hortícolas mais comercializados no mundo. Na Ásia, a China e a Índia são considerados os maiores produtores, respondendo por 35,6 % da produção e 34,6 % da área plantada. Na África, os maiores produtores são Egito e Nigéria e, na América do Norte, os Estados Unidos e México são os principais representantes. Na América do Sul o Brasil, com 67.605 ha plantados e com uma produção de 4.310 mil T, assume um papel de destaque, sendo considerado o 9º maior produtor mundial (IBGE, 2011; CEPA, 2009; FONTES; SILVA, 2002; ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2009).

Dentre as plantas oleráceas, o tomateiro está entre as mais cultivadas no Brasil (PENTEADO, 2004). Segundo dados publicados pelo IBGE (2011), o rendimento médio brasileiro na safra de 2008/09 foi de 63.680 kg.ha⁻¹. Na safra 2010/11 o rendimento médio ficou em 59.327 kg.ha⁻¹, 2,2 % menor que a safra anterior e 6,9 % inferior ao obtido na safra 2008/09. Em 2012 o rendimento médio de tomate foi de 63.068 kg (IBGE, 2012).

O principal produtor brasileiro é o estado de Goiás, responsável por 23,0 % da área cultivada no País e por 27,5 % da produção. Já Santa Catarina está entre os 11 maiores produtores do Brasil, sendo Caçador o município de maior área plantada no estado, com uma produtividade de 85.000 kg.ha⁻¹. Águas Mornas, com uma área de 200 ha, é o segundo município com maior área plantada em Santa Catarina, porém sua produtividade de 50.000 kg.ha⁻¹ fica aquém da obtida pelos demais municípios de destaque no cultivo do tomate (IBGE, 2011).

Além de destacar-se na economia, o tomate contém um valor inestimável para a dieta humana. O fruto é rico em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. Possui grandes quantidades de vitaminas B e C, ferro e fósforo, e é fonte primária de compostos antioxidantes como ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos (SILVA; GIORDANO, 2000; GIOVANELLI; PARADISO, 2002; NAIKA et al., 2006).

Mesmo sendo uma cultura de importância econômica e nutricional, o tomateiro é acometido por diversas doenças que podem restringir a sua produtividade, a sua qualidade comercial e nutricional, entre as quais, as mais importantes são a Mancha-bacteriana (*Xanthomonas* spp.), Murcha Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), Requeima ou Crestamento (*Phytophthora infestans*), Talo Oco (*Pectobacterium carotovora*), Oídio (*Oidium lycopersici*), Pinta Preta (*Alternaria solani*), entre outras (GALLI, 1980).

1.1.3 Mancha bacteriana

A doença provocada por espécies do gênero *Xanthomonas* em plantas de tomate foi observada pela primeira vez na África do Sul em 1914. Sua descrição foi realizada por Doidge em 1920, que denominou a moléstia como cancro do tomate, com o agente causal *Bacterium vesicatorium*. Gardner e Kendrick, um ano após a primeira identificação da bacteriose, designaram-na como mancha bacteriana, nome atual da doença, tendo como suposto agente causal *B. exitiosum*. Em 1978, Dye realizou um novo estudo de identificação e denominou o agente como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (JONES, STAL e BOUZAR, 1998; YOUNG, 2001).

O avanço da tecnologia permitiu que Vauterim et al. (1990) e Stall et al. (1994) analisassem e determinassem os padrões de proteínas de linhagens de *Xanthomonas*. Estes autores descobriram que a *X. campestris* pv. *vesicatoria* podia ser dividida em duas espécies: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*. Além dessas, foram descritas as espécies *X. perforans* e *X. gardneri*, sendo que a última foi isolada por Sutic em 1957, na Iugoslávia, e inicialmente denominada de *Pseudomonas gardneri* (BOUZAR et al., 1999; JONES et al., 2004).

Atualmente, existem quatro grupos descritos de *Xanthomonas* do tomateiro, denominados de A, B, C e D. Além disso, dentro desses grupos existem pelo menos três espécies distintas, como por exemplo, a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A), a *X. vesicatoria* (grupo B) e a *X. gardneri* (grupo D). Com base em estudos realizados por Bouzar et

al. (1999), esta última espécie citada é um organismo caracterizado pela sua inabilidade em hidrolisar amido e pectato e pela utilização de gentiobiose como única fonte de carboidrato.

A *X. gardneri*, inicialmente, foi considerada por Dye (1966) como sinônimo de *X. vesicatoria*, pois não podia ser diferenciada através de testes fisiológicos e de patogenicidade. Contudo, atualmente sabe-se que a *X. gardneri* é uma entidade taxonômica distinta da *X. vesicatoria* e da *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, pois Hildebrand, Palleroni e Schroth (1990) e Palleroni et al. (1993), ao realizarem hibridizações de DNA, observaram que a espécie em questão estava mais relacionada com *X. campestris* pv. *carotae*, *X. campestris* pv. *pelargonii* e *X. campestris* pv. *taraxaci* (JONES et al., 2000).

A bactéria *X. gardneri*, assim como as outras espécies de *Xanthomonas*, é gram-negativa, flagelada, aeróbia, possui forma de bastonete e mede 0,7 - 1,0 x 2,0 - 2,4 µm. Em meio de cultura, forma colônias pequenas, menores que as formadas por outras espécies do gênero, viscosas, circulares e amareladas, devido à presença de xanthomonadina. Esse pigmento está relacionado à regulação de processos fisiológicos da bactéria, como produção de polissacarídeo extracelular (JONES et al., 1991).

Apesar de existirem poucos estudos a respeito da *X. gardneri* no Brasil, recentemente uma pesquisa, realizada para a verificação das espécies da população de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana no tomateiro, revelou que *X. gardneri* é uma das mais importantes espécies causadoras da doença na região Centro-Oeste do país (QUEZADO-DUVAL et al., 2005).

As *Xanthomona*, no seu ambiente natural, disseminam-se principalmente através de sementes, respingos de água e restos de vegetais contaminados. A sua infecção ocorre através de aberturas naturais da planta, como os estômatos, e por ferimentos. A mancha-bacteriana é uma doença favorecida por temperaturas entre 20 e 30 °C, sendo mais severa em locais onde ocorrem chuvas associadas a ventos fortes e a terrenos arenosos (LOPES; ÁVILA, 2005; LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005).

Todas as espécies do gênero *Xanthomonas* são fitopatogênicas e os sintomas provocados pelas espécies associadas à mancha-bacteriana do tomateiro podem aparecer de diversas formas, como por exemplo, manchas necróticas no limbo foliar, de formato arredondado e com halo amarelado nas bordas (FIGURA 1). A doença pode atacar todos os órgãos aéreos do vegetal, porém, a infecção nas folhas e a consequente desfolha são problemas mais sérios, provocando uma redução da área

fotossintética, levando à diminuição da produção e da qualidade dos frutos (ROMEIRO, 2005; SILVA-LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005).

FIGURA 1. Sintomas da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) em folhas de tomateiro.



Para evitar o aparecimento desta doença na plantação, é importante a utilização de sementes de boa qualidade, nunca extraídas de frutos com sintomas. Deve-se plantar em áreas bem ventiladas e distantes de lavouras velhas de tomate e pimentão. Resistência varietal existe em tomateiro, mas devido à alta adaptabilidade genética do patógeno torna-se difícil o desenvolvimento de variedades resistentes de alta estabilidade. Outro método de prevenção muito utilizado é o químico. Porém, devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos, esta forma de controle vem acarretando no aumento do percentual de custo de produção, em impactos ambientais, em danos aos seres vivos e no favorecimento da seleção de raças resistentes aos ingredientes ativos (QUEZADO-DUVAL et al., 2005; SILVA; FAY, 2006).

1.2 A CULTURA DA COUVE-FLOR

1.2.1 Características botânicas e histórico da couve-flor

A couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.), variedade botânica descendente da couve-silvestre (*B. oleracea* var. *silvestris*), é uma espécie hortícola pertencente à família *Brassicaceae*, anteriormente denominada *Cruciferae*. Esta planta apresenta folhas alongadas, com limbo etílico. A sua flor é hermafrodita, possuindo quatro sépalas e

quatro pétalas, e seu fruto é uma siliqua, com número de sementes variando de um a sete. A parte comestível da couve-flor é uma inflorescência imatura, constituindo uma cabeça de coloração branca, creme, amarela, roxa ou verde, que se desenvolve sobre um caule curto (SILVA; CASALI, 1981; MAROTO-BORREGO, 1995; FILGUEIRA, 2000).

As cultivares de couve-flor podem ser classificadas de acordo com o número de dias necessários para a produção de cabeça. Desta forma, as variedades podem ser precoces, com 80 a 110 dias de ciclo; medianas, com 110 a 130 dias de ciclo; tardias, com 130 a 150 dias de ciclo. A variedade Bola de Neve, por exemplo, é uma cultivar considerada de média precocidade, pois é adaptada a condições de temperatura entre 16 e 18 °C e possui ciclo de 120 dias (SILVA; CASALI, 1981).

De acordo com Snogerup, Gustafsson e Von Bothmer (1990) a forma selvagem da couve-flor cresce ao longo da costa do Mediterrâneo da Grécia até a costa atlântica da Espanha e da França, por volta do litoral da Inglaterra. Esta espécie é cultivada no oriente médio desde a antiguidade, entretanto, somente a partir do século XII o cultivo começou a se expandir para outras partes do mundo. A couve-flor foi levada à Europa no séc. XVI e introduzida no Brasil no século XIX, onde é produzida e comercializada até os dias atuais.

1.2.2 Importância econômica e nutricional da couve-flor

A produção mundial de espécies de couve no ano de 2010, de acordo com os dados da FAO, foi de aproximadamente 68 milhões de T, sendo que a produção de couve-flor foi de 19,8 milhões de T. Sabe-se que mais de 70,0 % desta produção concentra-se no continente asiático, cabendo a liderança à China com 41,1 milhões de T. Segundo o IBGE, no ano de 2006, o Brasil produziu 141.806 T de couve-flor, sendo que os estados com maior produtividade foram São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Santa Catarina é considerado o sexto maior produtor do país, com uma produção de 10.757 T. O município de Águas Mornas/SC é o maior produtor da região, contribuindo com aproximadamente 53,0 % do montante produzido no estado.

A couve-flor possui grande importância para os agricultores familiares que, normalmente, cultivam-na em pequenas áreas ao longo do ano. A produção expressiva de brássicas, como a couve-flor, ocorre principalmente devido ao seu sabor e também ao seu potencial

nutricional. A couve-flor, por exemplo, possui 93,0 % de água, sais minerais e vitaminas importantes para o organismo humano, além disso, é considerada uma boa fonte de potássio e de fibra.

Desta forma, percebe-se que o cultivo da couve-flor tem uma importância relevante na horticultura brasileira, devido ao volume produzido e ao valor nutricional das culturas. Porém, mesmo adaptadas às condições edafo-climáticas das regiões produtoras, o desenvolvimento e a produtividade da couve-flor podem ser prejudicados pela ocorrência de doenças, dentre as quais destaca-se a podridão negra, causada por uma espécie de *Xanthomonas*.

1.2.3 Podridão negra

A podridão negra é a principal doença bacteriana das brássicas, manifestando-se em qualquer idade das plantas. Seu agente causal, a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, ocorre em muitas regiões do mundo, inclusive no Brasil. O patógeno ataca diversas espécies de brássicas e sobrevive em sementes, o que facilita a sua disseminação e introdução em áreas livres da doença (WILLIAMS, 1980; MARINGONI, 2005).

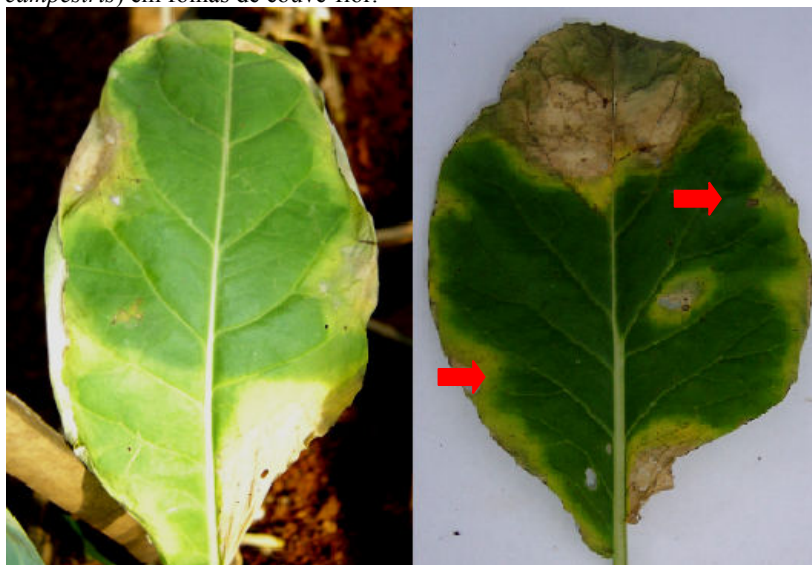
A *X. campestris* pv. *campestris* é uma bactéria gram-negativa, possui a forma de um bastonete reto, medindo cerca de 0,4 a 0,7 μm de largura por 0,7 a 1,6 μm de comprimento, possui um único flagelo polar e produz pigmentos amarelos, denominados xantomonadinas, que conferem uma coloração amarelada às colônias crescidas em meio de cultura, caracterizando espécies do gênero *Xanthomonas*. Além deste pigmento, a *X. campestris* pv. *campestris* produz um exopolissacarídeo capsular característico da espécie, chamado de goma xantana. Este polissacarídeo, por sua vez, tem a função de proteger a célula bacteriana contra intempéries do ambiente, como variações de temperatura e umidade (ONSANDO, 1992).

Quando a temperatura ambiente está entre 28 e 30 °C e a umidade relativa alta, o crescimento bacteriano e a penetração do microrganismo através das aberturas naturais da planta são favorecidos. O agente causal da podridão negra, ao infectar o vegetal, pode multiplicar-se intensivamente e chegar a atingir os vasos do xilema, fazendo com que os mesmos fiquem escurecidos e com sintomas que caracterizam o nome popular da doença (MARINGONI, 2005).

Os sintomas da podridão negra manifestam-se em qualquer idade da planta. Em plântulas, os cotilédones apresentam-se murchos e com aspecto queimado. Nas plantas adultas, as lesões foliares aparecem

necróticas e em formato de “V”, com o vértice voltado para o centro do limbo e com halo amarelado ao redor do tecido necrosado (FIGURA 2). Em alguns casos, observa-se subdesenvolvimento, murcha, queda prematura das folhas e apodrecimento das plantas afetadas. Este último sintoma ocorre quando a bactéria atinge os vasos condutores da planta (MATSUOKA et al., 1985; MARINGONI, 2005; CARRIJO; RÊGO, 2000).

FIGURA 2. Sintomas da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em folhas de couve-flor.



Devido ao fato da bactéria ser transmitida por sementes, a sanidade do material propagativo é fundamental no controle da podridão negra. Por isso, é importante o plantio de sementes certificadas. Outras medidas, como por exemplo, a rotação de culturas com plantas de variados gêneros e o plantio de híbridos ou cultivares resistentes, devem ser adotados para minimizar o problema. O método químico também pode ser utilizado para o controle da doença, no entanto, muitas vezes, é efetuado de maneira não racionalizada e pode levar ao aumento do percentual de custo de produção, ao favorecimento da seleção de raças resistentes aos produtos aplicados, etc. Devido a este fato, tem-se buscado métodos alternativos ao controle convencional de doenças,

como por exemplo, a indução de resistência (HAYWARD; WATERSTON, 1965; WILLIAMS, 1980).

1.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

1.3.1 Conceitos e definições

Durante o processo evolucionário, as plantas desenvolveram mecanismos próprios de defesa para dificultar a colonização dos seus tecidos por agentes patogênicos. Estes mecanismos podem ser divididos em pré-formados e pós-formados, ou seja, em mecanismos que existem antes do contato do microrganismo com o seu hospedeiro e em mecanismos que são ativados após o contato do patógeno com a planta, respectivamente (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Fatores anatômicos constitutivos e químicos, como a cutícula, a parede celular e inibidores químicos pré-formados, podem prevenir de forma eficiente a infecção ou a colonização de tecidos vegetais por microrganismos fitopatogênicos. Porém, muitas vezes, estes mecanismos de defesa não são suficientes para evitar a infecção da planta, por isso, a penetração de determinados microrganismos nos vegetais leva à ativação do sistema de defesa pós-formado dos mesmos. Estes mecanismos pós-formados, por sua vez, atuam na inibição do potencial colonizador do fitopatógeno (SOARES; MACHADO, 2007).

A ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta é propiciada pela sinalização, ou seja, pelo reconhecimento do patógeno pela planta. Esse processo, mediado por receptores celulares capazes de interagir com elicitores, gera um sinal que é amplificado para o sítio de ação no interior da célula e que, posteriormente, é traduzido e revertido em ativação de genes envolvidos com a produção de proteínas relacionadas à patogênese, com a produção de fitoalexinas, com a ativação de mecanismos de defesa estruturais, como por exemplo, genes responsáveis pela deposição de calose (1,3 β - glucano) que é acompanhada por posterior lignificação, entre outros (LEITE et al., 1997; CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

O reconhecimento entre hospedeiro e microrganismo tem um papel fundamental na interação entre plantas e seus agentes patogênicos. Os patógenos, por exemplo, possuem a capacidade de detectar a presença de plantas hospedeiras em seu ambiente e, além disso, são capazes de reconhecer características específicas da superfície do seu anfitrião, para efeito de infecção. Em contrapartida, as plantas possuem mecanismos sofisticados para detectar a multiplicidade de

agentes patogênicos potenciais em seu ambiente e para ativar sua defesa na presença de determinados microrganismos ou elicitor (interação incompatível). Porém, quando as plantas não conseguem reconhecer o patógeno ou a sua molécula elicitora, as respostas de defesa latentes acabam não entrando em ação e, por isso, há o desenvolvimento da doença, que pode culminar na redução da produtividade, na alteração do metabolismo vegetal e até mesmo na morte da planta (interação compatível) (BELL, 1981; BOLLER, 1995; HAHN, 1996; METRAUX, 2001; CLUZET et al., 2004).

O termo elicitor foi originalmente utilizado para se referir a moléculas que induzem a síntese e acúmulo de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) em células vegetais. Porém, hoje, este é comumente utilizado para designar moléculas, de origem exógena ou endógena, biótica ou abiótica, que estimulam qualquer mecanismo de defesa das plantas. Exemplos de mecanismos induzidos por elicitores incluem a síntese e acúmulo de fitoalexinas, a síntese de proteínas que inibem a ação de enzimas produzidas por patógenos, a formação de estruturas de defesa histológica, a produção de novas classes de proteínas relacionadas à patogênese e uma resposta de hipersensibilidade seguida por morte celular programada, entre outros (KEEN, 1975; DIXON, 1986; EBEL, 1986; HAHN, 1996; STICHER; MAUCHMAN; METRAUX, 1997).

O processo de ativação de mecanismos de defesa, resultante dos estímulos provocados por moléculas elicitoras, é chamado de indução de resistência do vegetal, que pode acontecer tanto no sítio de contato do indutor com a planta, como em locais distantes do mesmo, ou seja, pode acontecer de forma local ou sistêmica. Assim, define-se a indução de resistência como um aumento do nível de resistência da planta, em consequência da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, utilizando-se de agentes externos. Uma vez que uma planta tenha sido estimulada, ela pode expressar essa capacidade defensiva melhorada independentemente do patógeno desafiador gerar uma interação incompatível ou compatível (PASCHOLATI; LEITE, 1995; STADNIK; MARASCHIN, 2004).

Por isso, as alterações na resistência vegetal vêm chamando a atenção da comunidade acadêmica para a investigação de potenciais indutores de resistência, como é o caso de determinados óleos essenciais, extratos de plantas medicinais, polissacarídeos de leveduras, moléculas químicas, entre outros. Alguns destes indutores, inclusive, já foram testados, registrados pelo mundo e liberados para uso na agricultura, como por exemplo, Oryzemat®, Bion®, Messenger®,

Oxycon® e Elexa® (DINIZ et al., 2006; FRANZENER et al., 2007). O Bion® (Acibenzolar-S-metil) é o único indutor de resistência liberado no Brasil, o qual é utilizado para o controle de doenças no tomateiro.

Sendo assim, a indução de resistência é uma das medidas promissoras para o controle de doenças vegetais, tendo em vista o potencial prático de aplicação destes conhecimentos no controle de doenças nas culturas. Através de moléculas elicitoras, mecanismos de defesa são ativados sem qualquer alteração no genoma da planta. Além disso, a aplicação de indutores permite que o vegetal fique em um estado de *priming*, ou seja, em um estado de “pré-condicionamento” ou de “alerta”, onde somente após o contato com o microrganismo ocorrerá a efetiva ativação da defesa latente do vegetal. Porém, em alguns casos, antes mesmo da planta entrar em contato com algum patógeno, o elicitor é capaz de levar à expressão máxima dos genes responsáveis por esta ativação da resistência. Este método de controle de fitopatógenos, que leva à redução de sintomas característicos de inúmeras doenças, tem sido empregado contra agentes fitopatogênicos tanto de natureza virótica, como de natureza bacteriana e fúngica (HAMMERSCHMIDT, 1999; CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002; LABANCA, 2002; CURSINO-SANTOS; DEFINA; MARTINEZ-ROSSI, 2003; STADNIK; MARASCHIN, 2004).

1.3.2 Mecanismos de defesa

A indução de resistência em plantas a patógenos é conhecida há muitos anos. Bernard (1911 *apud* ROMEIRO; RODRIGUES, 2007), observou, em uma de suas pesquisas, que pedaços de bulbos sadios de orquídea transferidos para meio de cultura infestado com fungos de solos não eram infectados, mas que a infecção ocorria se os bulbos fossem previamente mantidos a 55° C por 35 minutos. O pesquisador sugeriu que os bulbos não tratados não sofriam infecção porque seus tecidos respondiam a secreções produzidas pelos fungos com a síntese de substâncias com propriedades antimicrobianas. Segundo Romeiro e Rodrigues (2007), talvez este seja um dos trabalhos mais antigos sobre ativação de mecanismos pós-formados de defesa em plantas contra microrganismos.

A efetividade e potencialidade da indução de resistência foi bem documentada por Chester (1933). Em seu trabalho, o autor demonstrou que plantas inoculadas com microrganismos atenuados ficavam protegidas contra subseqüentes infecções pelo mesmo microrganismo ou contra outros semelhantes. A partir desse estudo, muitas pesquisas

foram e continuam sendo realizadas a respeito do assunto, para uma melhor compreensão das respostas estruturais e bioquímicas da planta na presença de agentes elicitores e para a confirmação da indução de resistência da mesma.

Entre os mecanismos de defesa ativados por elicitores, o mais eficiente e documentado é a reação de hipersensibilidade (RH). A RH é, muitas vezes, condicionada pela presença de um gene de avirulência (Avr) no patógeno, que pode ser reconhecido pela planta quando a mesma possui o gene de resistência correspondente (R). Ocorrido o processo de reconhecimento entre microrganismo e hospedeiro, umas das primeiras mudanças na célula vegetal durante o desencadeamento da RH, é o rápido fluxo de íons através da membrana plasmática e o aumento de espécies ativas de oxigênio. O rápido fluxo de íons, caracterizado pela absorção de Ca^{+2} e exportação de Cl^- e K^+ , resulta na alcalinização do citoplasma e, conseqüentemente, no comprometimento da atividade celular. O aumento das espécies ativas de oxigênio, resultado da explosão oxidativa, pode levar à perda da integridade e viabilidade da célula. Essas mudanças, por sua vez, podem levar a morte de células que ficam em contato direto com o patógeno, evitando o desenvolvimento do microrganismo sobre o tecido vegetal (MOREL; DANGL, 1997).

Durante a ativação da RH, além da explosão oxidativa e do aumento no fluxo de íons, ocorre a indução da produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta, como, por exemplo, as PR's proteínas, como as peroxidases envolvidas na lignificação, e as enzimas do metabolismo secundário envolvidas na biossíntese de antibióticos (VAN LOON, 1997; CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

As PRPs são proteínas codificadas por plantas, que atuam como uma resposta bioquímica à infecção de patógenos. Estas proteínas foram investigadas pela primeira vez no início da década de 70, por van Loon e van Kammen (1970), como macromoléculas envolvidas na resistência induzida, tendo fumo-TMV como patossistema modelo. Esta descoberta, segundo Linthorst (1991), permitiu a caracterização da maior parte das PRPs conhecidas nos dias de hoje. Dentre aquelas relacionadas à patogênese, as β -1,3 glucanases e as quitinases possuem um importante papel no mecanismo de defesa das plantas, pois atuam na desorganização da parede celular de fitopatógenos.

Assim como as β -1,3-glucanases, as quitinases apresentam ação antimicrobiana, devido a sua ação lisozímica sobre a parede celular de determinados microrganismos (STINTZI et al., 1993). Cavalcanti et al.

(2006a) constataram a eficiência do Acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g.l⁻¹), da suspensão de quitosana (200 g.l⁻¹) proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso* e do extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados por *C. pernicioso* (300 g.l⁻¹), na capacidade parcial de proteção das plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Segundo os autores, esta proteção é devido à capacidade destas substâncias de promoverem o aumento na atividade de quitinases e β -1, 3-glucanases.

Além das quitinases e glucanases, as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (FAL) são outros exemplos de enzimas envolvidas na atuação dos mecanismos de defesa das plantas. As peroxidases, por exemplo, são glicoproteínas associadas à membrana que estão envolvidas, dentre outros processos, na deposição de lignina na parede celular das plantas. E por sua vez, estão intimamente ligadas na defesa vegetal. Li et al. (2012), ao aplicarem silicato de sódio (100 mM) em melão, observaram uma redução substancial da severidade da podridão rosa (*Trichothecium roseum*) e um aumento significativo das enzimas peroxidase superóxido dismutase, glutatona redutase e polifenoloxidase.

A FAL é a proteína responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico, por sua vez, pode ser incorporado em diversos fenólicos, os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. Com isso, o aumento da atividade da FAL nas plantas tem sido apontado como um indicador de elicitação e indução de resistência, pois, um determinado elicitor, pode induzir à síntese desta enzima e aumentar a concentração de compostos de defesa, como por exemplo, a de fitoalexinas. Além disso, a FAL é responsável pelo incremento na biossíntese de derivados fenilpropanóides necessários à formação de lignina, que confere às paredes celulares uma maior rigidez e resistência à degradação por enzimas secretadas pelo patógeno (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980; RIDE, 1980; BOLWELL et al., 1991; DEFFUNE, 2001).

As polifenoloxidases (PFO) são um grupo de enzimas que também são ativadas após a elicitação. Estas proteínas são responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis transformando-os em quinonas. Nas plantas, estas proteínas permanecem no interior das células, dentro dos tilacóides nos cloroplastos, separadas dos compostos fenólicos, que também ficam armazenados nos vacúolos. Quando ocorre a ruptura celular, provocada por microrganismos, as PFO são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos, produzindo as

chamadas quinonas, consideradas moléculas antimicrobianas. Por isso, pode-se afirmar que estas enzimas possuem um importante papel na indução de resistência vegetal (VAUGHN; DUKE, 1984; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que constituem um dos grupos mais comuns e generalizados de substâncias em plantas. De acordo com Harborne (1989), os "fenólicos" ou "polifenóis" podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático, com um (fenol) ou mais (polifenol) substituintes hidroxilo, incluindo derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos, etc). Estes compostos, além de serem oxidados por enzimas como as PFO e de contribuírem para a defesa vegetal contra doenças, são importante para a pigmentação, crescimento e reprodução das plantas (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006).

Chérif, Asselin e Bélanger (1994), ao estudarem o efeito de silicatos solúveis contra *Pythium aphanidermatum*, concluíram que a conversão de fenóis a compostos tóxicos, proporcionados pelas PFO, foi em grande parte responsável pelo aumento da resistência em plantas de pepino. Jaiti, Verdeil e El Hadrami (2009) verificaram que a aplicação do ácido jasmônico (50 mM) sobre raízes de palmeiras aumentaram a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas e, consequentemente, levou à redução do Bayoud provocado pelo *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*.

Desta forma, a indução de resistência, que leva à ativação de mecanismos latentes de defesa da planta, pode ser considerada uma forma de controle de fitopatógenos. Além de levar à redução da severidade e da incidência de inúmeras doenças, o processo pode substituir, em alguns casos, métodos convencionais de controle e, assim, reduzir a utilização de agrotóxicos em determinados cultivos.

1.4 A UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E DA BABOSA NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Os polissacarídeos derivados de microrganismos e de vegetais são classes bem caracterizadas de elicitores que, em determinados casos, podem induzir respostas de defesa até mesmo em concentrações muito baixas, da ordem de nmol.l^{-1} . Devido à bem caracterizada natureza química de polissacarídeos vegetais e microbianos e também à alta percepção destas moléculas pelas plantas, alguns destes elicitores têm sido utilizados como modelos para estudos relacionados à indução de

resistência (NURBERGER et al., 2004). Além disso, a aplicação de polissacarídeos pode representar uma alternativa ao controle convencional de fitomoléstias, pois os mesmos são abundantes, prontamente disponíveis e podem ser obtidos a partir de fontes renováveis.

Diversos tipos de polissacarídeos, oligossacarídeos e monossacarídeos que possuem características elicitoras e que são capazes de controlar doenças fitopatogênicas de importância agrônômica têm sido descritos na literatura. Dentre esses pode-se destacar os oligossacarídeos de β -glucana, as quitinas, as quitosanas e os exopolissacarídeos presentes em cápsulas de determinadas bactérias (KLARZYNSKI et al., 2000; BACH, 1997).

As quitosanas podem ser obtidas a partir da desacetilação da quitina encontrada na carapaça de crustáceos ou da parede celular de alguns fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum* (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004). Esses polissacarídeos possuem ação antimicrobiana contra determinados microrganismos, como a *Xanthomonas gardneri* (COQUEIRO, 2010), *Botrytis cinerea* (BEN-SHALOM et al., 2003), *Euphorbia pulcherrima* (LI et al., 2008), *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora* (RABEA et al., 2009), entre outros, e podem ativar mecanismos de defesa de plantas, como por exemplo, do tomateiro (COQUEIRO, 2010).

Muitos procariotos sintetizam uma volumosa cápsula de natureza polissacarídica que fica localizada externamente à célula bacteriana, que, assim como a quitosana, também podem atuar na defesa de plantas contra doenças de importância agrônômica. O exopolissacarídeo capsular, que é o principal constituinte deste polímero orgânico em bactérias fitopatogênicas, é formado por unidades de pentassacarídeo, por um grupo acetil e um ceto-piruvato ligados a duas moléculas de manose, respectivamente. Os resíduos de glicose presentes nessa estrutura polissacarídica ligam-se a trissacarídeos, que são formados por uma molécula de glicose e duas de manose. O peso molecular do exopolissacarídeo varia de acordo com a espécie bacteriana, porém é sempre elevado, atingindo a cifra de milhões de daltons (SILVA, 2003; ROMEIRO, 2005).

Pesquisas têm demonstrado que o exopolissacarídeo capsular de algumas bactérias possui função de toxina, provocando sintomas quando aplicados em plantas mesmo na ausência de células vivas do fitopatógeno (ROMEIRO, 2005). Em contrapartida, outros estudos vêm comprovando a eficiência deste polissacarídeo como indutor de

resistência contra moléstias de planta. Bach (1997) e Bach, Barros e Kimati (2003), por exemplo, ao aplicarem o exopolissacarídeo capsular de *Xanthomonas campestris*, denominado de goma xantana, a uma concentração de $0,5 \text{ mg.mg}^{-1}$, em plantas de trigo, observaram resistência induzida contra *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana*, e *Drechslera tritici-repentis*.

O mesmo foi observado por Castro e Bach (2004) ao tratarem plantas de cevada com goma xantana, a $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, em diferentes intervalos de tempo entre a administração do indutor e a inoculação do *Bipolaris sorokiniana*, agente causal da helmintosporiose da cevada. De acordo com os autores, o exopolissacarídeo levou a uma indução de resistência tanto local, como sistêmica, chegando a proteger a planta da doença em até 100 %. Segundo Guzzo et al. (1993), em plantas de café, a aplicação de exopolissacarídeos extraídos da cápsula bacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e da goma xantana comercial (obtida a partir de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), induziu resistência contra *Hemileia vastatrix*, reduzindo a severidade da doença em até 92 %.

Além dos polissacarídeos já mencionados, também tem sido observada a eficiência de compostos presentes em plantas medicinais. Segundo Schwan-Estrada e Stangarlin (2005) e Schwan-Estrada (2002), a exploração da atividade biológica de compostos secundários, presentes no extrato bruto ou em óleos essenciais de plantas medicinais, pode representar mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas, principalmente pelo fato de muitos extratos possuírem um efeito antimicrobiano e indutor de resistência. Bonaldo et al. (2004), observaram uma redução no número e no tamanho das lesões de *Colletotrichum lagenarium* nas folhas verdadeiras de pepino quando tratadas com extrato bruto de *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecido como manjerição. Schwan-Estrada e Stangarlin (2005) afirmam que, além desta, existem outras plantas que vêm sendo analisadas para fins de controle de doenças, como por exemplo, a *Aloe barbadensis* Miller.

A espécie *Aloe barbadensis*, também conhecida como *Aloe vera* (L.) Burm. f, pertencente à família *Liliaceae*, é uma planta nativa do continente africano e adaptada a diversas regiões do Brasil. Esse vegetal, popularmente conhecido como babosa, contém folhas lanceoladas e espessas, sendo que no seu interior existe uma grande quantidade de mucilagem e parênquima de reserva. O parênquima de reserva, por sua vez, contém alto conteúdo de água e aproximadamente 60 % do remanescente sólido é constituído por polissacarídeos, que vêm sendo

estudados pelo seu potencial medicinal. Além destes, mais de 75 ingredientes ativos já foram documentados na *Aloe barbadensis*, como enzimas, vitaminas, lignina, aminoácidos e ácido salicílico (FEMENIA et al., 1999; CHOI; CHUNG, 2003; WICHTL, 2004; HABEEB et al., 2007; PANDEY; MISHRA, 2010).

Estes compostos ativos têm demonstrado que a babosa é uma planta que possui variadas propriedades farmacêuticas, como: anti-inflamatória (YAGI et al., 2002), antioxidante (YAGI et al., 2003), anticancerígena (SU et al., 2005), imunoestimulante e antifúngica (LEE et al., 2001), especificamente contra *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum*, *Heterosporium pruneti* e *Penicillium gladioli* (CASIAN et al., 2007). Apesar dos poucos estudos relacionados ao efeito antimicrobiano em doenças vegetais, alguns autores diagnosticaram o efeito da babosa contra fitopatógenos, como é o caso da pesquisa realizada por Jasso de Rodríguez et al. (2005), que verificaram a eficiência de frações líquidas de babosa na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes* da batata.

CAPÍTULO 2 – POTENCIAL DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

2.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma das olerícolas mais consumidas, produzidas e comercializadas no mundo. Apesar da sua grande importância econômica, a planta de tomate é acometida por diversas doenças, entre as quais a mancha bacteriana se destaca. Essa doença é causada por espécies de *Xanthomonas* que, no seu ambiente natural, disseminam-se principalmente através de sementes, respingos de água e restos de vegetais contaminados. Todas as espécies do gênero *Xanthomonas* são fitopatogênicas e os sintomas provocados pelas espécies associadas à mancha-bacteriana do tomateiro podem aparecer de diversas formas, como por exemplo, manchas necróticas no limbo foliar, de formato arredondado e com halo amarelado nas bordas. A doença pode atacar todos os órgãos aéreos do vegetal, porém, a infecção nas folhas e a consequente desfolha são problemas mais sérios, provocando uma redução da área fotossintética, levando à diminuição da produção e da qualidade dos frutos (SILVA-LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005).

Para o controle da mancha bacteriana utilizam-se principalmente compostos à base de cobre. Porém, devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos, esta forma de controle tem levado ao aumento do percentual de custo de produção, em impactos ambientais, em danos aos seres vivos e no favorecimento da seleção de raças resistentes aos ingredientes ativos. Além disso, estes produtos cúpricos não têm sido eficientes no controle da mancha bacteriana (SILVA; FAY, 2006; ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2009).

Devido à falta de eficiência dos produtos atualmente disponíveis para o controle da mancha bacteriana e também devido aos problemas ambientais provocados pela utilização indiscriminada de agrotóxicos, tem-se buscado formas de controle mais eficientes e menos impactantes ao meio ambiente. Dentre esses métodos alternativos de controle, pode-se destacar a indução de resistência, que busca conferir resistência às plantas a determinadas doenças sem qualquer alteração no genoma vegetal. Sendo assim, com a aplicação de moléculas elicitoras, mecanismos de defesa latentes da planta são ativados.

Dentre as moléculas elicitoras já estudadas, podemos destacar as de origem polissacarídica. Os polissacarídeos, além de serem precursores de elicitores, estão prontamente disponíveis na natureza e

podem ser obtidos de fontes renováveis, como de algas, plantas e fitopatógenos. Aqueles derivados de microrganismos e vegetais são classes bem caracterizadas de moléculas elicitoras que, em determinados casos, podem induzir respostas de defesa até mesmo em concentrações muito baixas, da ordem de nmol.l^{-1} . Por isso, devido à sua bem caracterizada natureza química e também à alta percepção destas moléculas pelas plantas, alguns destes elicitores têm sido utilizados como modelos para estudos relacionados à indução de resistência, dentre eles pode-se destacar as quitosanas, que são polissacarídeos obtidos a partir da parede celular de fungos e carapaça de crustáceos, e aqueles presentes em plantas, como a babosa.

A babosa contém folhas lanceoladas e espessas, sendo que no seu interior existe uma grande quantidade de mucilagem, composta majoritariamente por moléculas polissacarídicas, dentre essas está a acemanana, que é um polissacarídeo muito semelhante à quitosana. A quitosana por sua vez, além de elicitar mecanismos de defesa em diversos vegetais, como no tomate, possui uma forte ação antimicrobiana contra determinados agentes fitopatogênicos.

Além dos polissacarídeos extraídos de plantas, também existem aqueles obtidos a partir de microrganismos. A goma xantana, por exemplo, é um exopolissacarídeo capsular que tem apresentado eficiência na indução de mecanismos de defesa vegetal (BACH; BARROS; KIMATI, 2003; PANDEY; MISHRA, 2010). Stangarlin et al. (1999), ao investigarem mecanismos de defesa em mesocótilos de sorgo, observaram que a babosa foi eficiente na indução de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas nesta planta. Castro e Bach (2004), ao tratarem plantas de cevada com goma xantana ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) verificaram que o polissacarídeo foi capaz de induzir resistência no vegetal contra *Bipolaris sorokiniana*.

Com isso, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito da goma xantana e de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* e do parênquima de reserva da babosa na proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana, e verificar o potencial elicitor dos polissacarídeos em questão sobre o tomateiro.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Condições de cultivo do tomateiro e obtenção do isolado de *Xanthomonas gardneri*

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de março de 2011 a outubro de 2012.

As sementes de tomateiro, da cv. Santa Cruz Kada, suscetíveis a *Xanthomonas* spp., foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células com substrato Germina Planta e mantidas em casa de vegetação sem controle ambiental. Após duas semanas da semeadura, as plântulas, com aproximadamente 7 cm de altura, foram transplantadas para vasos de 2l de capacidade, com terra preta adubada. As temperaturas (máxima, mínima e atual) no interior da casa de vegetação foram anotadas diariamente e, ao fim de cada experimento, efetuou-se uma média entre os dados coletados.

O isolado de *Xanthomonas* foi obtido a partir de plantas de tomateiro da cultivar Carmem apresentando sintomas da mancha bacteriana, cultivadas em Águas Mornas-SC, e cedidas gentilmente pela Empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. A identificação da bactéria foi realizada junto a Embrapa - DF, mais especificamente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ), pela Dra. Alice Maria Quezado Duval. Através de BOX-PCR, usando o primer 5'- CTACG-GCAAGGCGACGCTGACG-3', constatou-se que o isolado tratava-se de *Xanthomonas gardneri* (Grupo D). Além disso, o genoma da *Xanthomonas* foi comparado com isolados de espécies associadas com a mancha bacteriana do tomateiro: IBSBF 2363 (*X. euvesicatoria*), IBSBF 2364 (*X. vesicatoria*), IBSBF 2370 (*X. perforans*) e IBSBF 2373 (*X. gardneri*), provenientes da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas (Brasil). A bactéria foi mantida em tampão fosfato (7,4 mM KH₂PO₄; 8,6 mM K₂HPO₄), à temperatura de 25 °C.

Para a obtenção do inóculo, foi realizada a repicagem desta bactéria, mantida em tampão, com auxílio da alça de platina, para placas de Petri contendo nutriente ágar (NA) [Composição (g.l⁻¹): peptona de carne 5,0; extrato de carne 3,0; ágar 12,0] (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após 48 h da primeira repicagem, as bactérias crescidas neste meio foram repicadas para novas placas de Petri com meio NA, tantas quantas forem necessárias para um determinado experimento, e incubadas por um período de 24 h a 25°C. A suspensão de colônias

bacterianas crescidas neste meio foi realizada com água destilada e ajustada para densidade ótica de 0,6 unidades de absorbância a 600 nm.

2.2.2 Extração dos polissacarídeos

Extração dos polissacarídeos da *Xanthomonas gardneri*.

Inicialmente, o isolado de *X. gardneri* foi cultivado em caldo nutriente, durante 36 horas a 25 °C. Posteriormente, 100 µL da suspensão bacteriana foi repicado para placas de Petri de 8,0 cm de diâmetro contendo meio nutriente ágar, as quais foram incubadas por 48 horas a 25 °C. Após o período de incubação, foram adicionados em cada placa de Petri 5 ml de solução salina tamponada (tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,0 em NaCl 0,85 %). As células bacterianas foram suspensas, com auxílio de uma alça de Drigalsky, e a suspensão bacteriana autoclavada a 121 °C por 1 h e centrifugada a 10.000 g por 20 minutos. O sedimento obtido na centrifugação foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado etanol 95 % até atingir concentração final de 70 % de etanol. A solução (Sobrenadante + Etanol) foi incubada por 12 horas a 4 °C. O sobrenadante, resultante da incubação em álcool, foi descartado e o sedimento seco em estufa a 40 °C até o seu peso constante. O produto final da secagem foi armazenado em congelador a - 20 °C até o momento da sua utilização (adaptado de SILVA, 2003).

Extração dos polissacarídeos do parênquima de reserva da babosa.

As folhas mais velhas e externas da *Aloe barbadensis*, fornecidas pela empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda®, foram colhidas na fazenda cafezal em Paulo Lopes/SC em março de 2011. O material colhido foi previamente lavado, suas extremidades basal (~1cm) e apical (~10cm) cortadas e o seu parênquima de reserva removido, triturado em aparelho multimixer (Walita® - modelo Billy RI 1340) e coado em coador (Antare® - Ø = 15 cm) para a retirada do material fibroso. Posteriormente, foram adicionados seis volumes de etanol 92 °GL para um volume do gel, sendo a mistura final mantida a 4 °C durante 24 h para a floculação de polissacarídeos de alto peso molecular. A porção polissacarídica foi filtrada a vácuo e seca em estufa a 40 °C até o seu peso constante. O material obtido foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó (CAMPESTRINI, 2007).

Quando de sua utilização, os polissacarídeos da babosa foram solubilizados em HCl 0,05 N mantendo-se a suspensão durante 15 min em agitação em ultra turrax (modelo T 18 basic - IKA®) a 3600

rotações por minuto, a temperatura ambiente, seguida de aquecimento em banho-maria durante 30 min a 100 °C. As suspensões de polissacarídeos foram resfriadas até 25 °C, incubadas a uma temperatura de 4 °C por 12 h e o pH ajustado para 5,6 utilizando-se NaOH 2M.

2.2.3 Obtenção da goma xantana comercial e do ASM

Nos experimentos também utilizou-se a goma xantana comercial da Sigma (Sigma-Aldrich, USA). Este produto possui um peso molecular ponderal médio estimado em 4×10^6 g.gmol⁻¹, 3,53 % de acetato, 0,9 % de piruvato e o polissacarídeo é proveniente da *X. campestris*. Para a sua utilização, misturou-se o mesmo em água destilada, mantendo-se a suspensão por 30 segundos em agitação em ultra turrax a 3600 rotações por minuto.

Já o acibenzolar-S-metil (ASM; C₈H₆N₂OS₂), éster-S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbótico, é o ingrediente ativo do produto comercial Bion® (Singenta). Este produto é o único indutor de resistência comercial registrado no Ministério da Agricultura do Brasil, possui formulação WG - Granulado Dispersível, com classificação toxicológica III. Seu uso é registrado para uma série de culturas, como feijão, tomate, citros e algodão para a prevenção de infecções fúngicas, bacterianas e viróticas (MAPA, 2011). Para sua utilização, diluiu-se o mesmo em água destilada.

2.2.4 Avaliação da severidade da mancha bacteriana do tomateiro

Efeito de doses de polissacarídeos sobre a severidade da mancha bacteriana. Para a avaliação do efeito da babosa sobre a mancha bacteriana do tomateiro, testaram-se as concentrações 0,75 mg.ml⁻¹, 1,5 mg.ml⁻¹, 3,0 mg.ml⁻¹ e 6,0 mg.ml⁻¹ de polissacarídeos do parênquima de reserva da babosa (PB), extraídos e preparados conforme o item 2.2.2, e as concentrações de 10 %, 20 %, 30 % e 40 % do parênquima de reserva da babosa (GEL), triturado previamente em processador de alimentos e diluído em água destilada.

Para a verificação do efeito da goma xantana comercial (GOMA) sobre a severidade da doença, testou-se o produto em quatro doses (0,25 mg.ml⁻¹; 0,75 mg.ml⁻¹; 1,5 mg.ml⁻¹; 3,0 mg.ml⁻¹). Além disso, o efeito dos polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) sobre a mancha bacteriana nas concentrações (0,5 mg.ml⁻¹; 1,0 mg.ml⁻¹; 1,5 mg.ml⁻¹; 2,0 mg.ml⁻¹; 2,5 mg.ml⁻¹; 3,0 mg.ml⁻¹; 3,5 mg.ml⁻¹), também foi avaliado.

Foram utilizados 8 ml de cada suspensão por planta, os quais foram aspergidos em todas as folhas com auxílio de uma pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58psi, bico 0,7mm de diâmetro, marca Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (marca Schulz, Brasil; pressão de 25lbf/pol²; potência de 180W; vazão de 105 ml.min⁻¹). Após 4 dias da aplicação dos tratamentos, foi feita a inoculação com *X. gardneri*, pulverizando-se a suspensão bacteriana nas superfícies abaxial e adaxial das folhas com a manutenção das plantas em câmara úmida por um período de 48 h. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para densidade óptica (DO) de 0,6 unidades de absorbância a 600 nm antes da inoculação.

A avaliação da severidade da doença (% da área foliar lesionada) foi realizada duas semanas após a inoculação, através do software Quant (VALE et al., 2003). Foram submetidas às análises duas folhas da porção intermediária de cada planta, totalizando em quatro folhas por vaso.

Utilizou-se a água destilada como controle negativo e ASM (25 µl.ml⁻¹) como controle positivo. As plantas foram cultivadas nos meses de junho e julho conforme o descrito no item 2.2.1., sob uma temperatura média de 19 °C e fotoperíodo < 12 h. Os tratamentos foram aplicados em plantas com pelo menos quatro folhas definitivas. Os ensaios foram repetidos duas vezes.

Os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo que a parcela experimental foi representada por um vaso com duas plantas. Os resultados foram submetidos à análise de regressão, utilizando o *software* estatístico Sisvar 7.0 (FERREIRA, 2003).

Efeito de intervalo de tempo entre tratamento e inoculação. Após a verificação da melhor concentração dos polissacarídeos para o controle da bacteriose em tomateiro, efetuou-se um ensaio para a determinação do melhor intervalo de tempo entre o tratamento das plantas de tomate e a inoculação das mesmas com a *X. gardneri* (6, 4 ou 2 dias). Neste experimento, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, nos meses de dezembro e janeiro, a uma temperatura média de 26 °C e fotoperíodo > 12 h. Sendo assim, além da avaliação dos intervalos, também objetivou-se avaliar a eficiência dos polissacarídeos no controle da mancha bacteriana sob condições ideais para o desenvolvimento da doença.

Nesse caso, as plantas de tomate, com quatro folhas definitivas, cultivadas conforme o descrito no item 2.2.1., foram pulverizadas com

PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) ou com PX (1,5 mg.ml⁻¹). Após um período de 6, 4 ou 2 dias, foram inoculadas com *X. gardneri* na concentração de 0,6 unidades de absorvância a 600 nm. Como controle utilizou-se a água destilada e o ASM (25 µl.ml⁻¹) em todos os intervalos testados. A avaliação da severidade da doença (% da área foliar lesionada) foi realizada aproximadamente duas semanas após a inoculação, através do *software* Quant (VALE et al., 2003), a partir de duas folhas da porção intermediária de cada planta.

Os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado com doze tratamentos e cinco repetições, sendo que a parcela experimental foi representada por um vaso com duas plantas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA *factorial*) e ao teste de Tukey, utilizando o *software* Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

2.2.5 Efeito antimicrobiano de polissacarídeos sobre a *X. gardneri*

A goma xantana, os polissacarídeos da *X. gardneri* e da babosa foram preparados conforme o descrito nos experimentos anteriores. Para isso, todo o material utilizado, inclusive a água destilada e o HCl, foi previamente autoclavado a 121 °C por um período de 20 minutos. Apenas os polissacarídeos não foram submetidos à autoclavagem. Separadamente, foi feito o meio NA. Logo após estes procedimentos de preparo, os polissacarídeos foram adicionados, individualmente, ao meio de cultura. Cada mistura obtida foi vertida em placas de Petri com 8 cm de diâmetro.

A preparação deu-se de modo que a concentração final dos polissacarídeos no meio de cultura fosse equivalente a 0,5; 0,75; 1,5 ou 3,0 mg.ml⁻¹. Após a solidificação do NA, alíquotas de 100 µL da bactéria (*X. gardneri*), com 0,3 unidades de absorvância a 600 nm, foram pipetadas sobre a superfície e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Como controle, foi utilizada água destilada incorporada em NA. As placas foram incubadas a 25° C por 48 h e a avaliação realizada através da obtenção de uma suspensão bacteriana em 10 ml de água destilada e leitura da absorvância em espectrofotômetro a 600 nm (COQUEIRO, 2010).

O experimento foi montado sob delineamento experimental inteiramente casualizado, com 13 tratamentos e cinco repetições, sendo cada parcela experimental representada por uma placa. Os resultados foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se o *software* estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003), e à análise de variância (ANOVA

factorial) e o teste de Tukey, utilizando-se o *software* Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

2.2.6 Reação de hipersensibilidade

A avaliação da reação de hipersensibilidade (RH) foi realizada conforme metodologia descrita por Thordal-Christensen et al. (1997), com adaptações. Para tanto, com auxílio de um furador de papel, foram retirados discos foliares ($\varnothing = 5,0$ mm) das plantas de tomateiro, em média, com quatro folhas definitivas, tratadas com PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), GOMA ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), PX ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) ou água destilada (controle) e inoculadas com *X. gadneri* (DO 0,6; 600nm), após 4 dias da aplicação dos tratamentos. Os tempos de amostragem foram 24 horas após o tratamento das plantas e 24 horas após a inoculação das mesmas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, nos meses de fevereiro e março, a uma temperatura média de $24,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo > 12 h.

Os discos foliares coletados foram incubados em placas de Petri ($\varnothing = 5,0$ cm) contendo 5 ml de solução de 3,3 - diaminobenzidiazol a 1 mg.ml^{-1} (DAB, Sigma, EUA), por um período de 8 h. Em seguida, foram submetidos ao clareamento em etanol 96 % fervente por 30 min e transferidos para uma solução de conservação (ácido láctico: glicerol: água, 1:1:1, v/v/v). Após estes procedimentos, o material foi montado em lâminas de vidro e visualizado em microscópio óptico (modelo FWL1500T, Feldmann Wild Leitz, Brasil) no aumento de 400x.

O número de células apresentando reação de hipersensibilidade foi avaliado em toda a superfície dos discos foliares e em seguida, foi transformado para número de células com RH/ cm^2 . Células com reação de hipersensibilidade ou com acúmulo de peróxido de hidrogênio apresentaram uma cor marrom-avermelhada.

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada uma das repetições representada por cinco discos foliares, e 10 tratamentos. Para verificar a diferença entre as médias, obtidas em cada um dos tempos de amostragem, foi utilizada a análise de variância (ANOVA *factorial*) e o teste de Tukey. As análises foram realizadas através do *software* Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

2.2.7 Análises bioquímicas realizadas com plantas de tomate

Aplicação dos tratamentos e coleta das amostras. Em plantas de tomate, com quatro folhas definitivas, aplicaram-se PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), GOMA ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), PX ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), água destilada (controle negativo) ou ASM ($25 \text{ }\mu\text{l.ml}^{-1}$) (controle positivo). Após 4 dias da aplicação, foi efetuada a inoculação das plantas com suspensão bacteriana de *X. gardneri* (DO 0,6; 600nm), conforme o descrito em experimento anterior. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o processo experimental, nos meses de fevereiro e março, a uma temperatura média de $24,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo $> 12 \text{ h}$, ideal para o desenvolvimento da bacteriose.

Das plantas tratadas, coletaram-se amostras foliares 0, 2, 4 e 6 dias após a aplicação dos polissacarídeos nas plantas. Nestas amostras coletadas, avaliou-se tanto a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, como o acúmulo de compostos fenólicos totais e flavonóides. Foram coletados cinco folíolos para cada repetição (100 mg), sendo realizadas cinco repetições por tratamento. Para as análises de peroxidases e polifenoloxidasas, utilizou-se a terceira folha definitiva da planta, de baixo para cima. Já para a quantificação de compostos fenólicos totais e flavonóides, utilizou-se a segunda folha, de baixo para cima.

Em um ensaio posterior, objetivou-se verificar o comportamento de enzimas em plantas submetidas a diferentes intervalos de tempo entre tratamento e inoculação. Para tanto, avaliou-se a atividade das peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de tomate, com 4 folhas definitivas, tratadas com PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), GOMA ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), PX ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), água destilada (controle negativo) ou ASM ($25 \text{ }\mu\text{l.ml}^{-1}$) e inoculadas com *X. gardneri* (DO 0,6; 600nm) 2, 4 ou 6 dias depois da aplicação dos tratamentos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, nos meses de maio e junho, a uma temperatura média de $19,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo $< 12 \text{ h}$.

Para o experimento relacionado à atividade de enzimas em intervalos de tempo entre tratamento e inoculação, efetuaram-se duas coletas, uma foi realizada momentos antes da inoculação e outra 48 h após a inoculação. Foram coletados cinco folíolos para cada repetição (100 mg), sendo realizadas cinco repetições por tratamento. Para as análises de peroxidases e polifenoloxidasas, utilizou-se a terceira folha definitiva da planta, de baixo para cima. Já para a determinação da atividade da FAL, utilizou-se a segunda folha definitiva do tomateiro, de baixo para cima.

Amostras coletadas, em todos os experimentos, foram armazenadas em papel alumínio e congeladas imediatamente a -80°C . O tecido foliar, mantido sob baixa temperatura, foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo.

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada uma das repetições representada por cinco folíolos (100 mg). Para análise do comportamento da atividade enzimática com o passar do tempo, após a aplicação dos tratamentos, foi realizada uma análise de regressão e a análise de variância (one-way ANOVA) e o teste Tukey dentro de cada tempo. Para o experimento que avalia o comportamento das enzimas nos intervalos de tempo entre tratamento e inoculação, foi utilizada a análise de variância (ANOVA *factorial*) e o teste de Tukey. As análises foram realizadas através dos *softwares* estatísticos Sisvar (FERREIRA, 2003) e Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

Determinação da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas. Para determinação da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, foi adicionado ao macerado foliar 1,5 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, polivinilpirrolidona 1 % (PVP) e fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 1mM. A suspensão obtida foi centrifugada a 20.000 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante (extrato protéico) recuperado.

A atividade das peroxidases foi determinada usando-se a metodologia de Hammerschmidt, Nuckles e Kuc (1982), com adaptações. Para a reação foram adicionados 50 μL do extrato proteico em 2,95 ml de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM. A atividade da enzima foi avaliada através do espectrofotômetro, onde foi medida a conversão do guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi conduzida por 4 min a 40°C , com os valores de DO sendo anotados a cada 30 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por mg de proteína por minuto ($\text{DO}_{470\text{ nm}}\text{ mg proteína}^{-1}\text{ min}^{-1}$).

Já a atividade das polifenoloxidasas foi determinada utilizando-se o método adaptado de Duangmal e Apentem (1999). Para a reação foram adicionados 200 μL do extrato proteico, em 2,8 ml de tampão fosfato 60 mM (pH 6,0) contendo catecol 60 mM. A atividade de polifenoloxidasas foi avaliada através do espectrofotômetro, onde mensurou-se a oxidação do catecol convertido em quinona. A reação foi conduzida por 1 min a 40°C , com os valores de DO sendo anotados a

cada 3 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 420 nm por mg de proteína por minuto ($DO_{420\text{ nm}} \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides. Para a quantificação de compostos fenólicos totais e flavonóides, adicionaram-se 3 ml de metanol 80 % acidificado (metanol: HCl = 80:1, v/v) ao tecido foliar macerado. A mistura obtida foi inicialmente incubada no escuro por 1 h em temperatura ambiente e posteriormente filtrada à vácuo, utilizando-se papel de filtro Qualy® ($\varnothing = 9,0 \text{ cm}$).

Na quantificação de compostos fenólicos totais, em 0,5 ml do filtrado misturou-se 0,5 ml de metanol 95 % (v/v) e agitou-se em vórtex. A essa mistura foram adicionados 1 ml de etanol 95 %, 1 ml de água destilada e 0,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 min, acrescentou-se 1 ml de Na_2CO_3 5 % (m/v), e incubou-se a amostra no escuro por 1 h em temperatura ambiente. A absorbância da solução final foi mensurada em espectrofotômetro ($DO_{725 \text{ nm}}$) e a quantificação de fenólicos foi baseada em uma curva padrão (0,0 - 100 μg) de ácido gálico. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca ($\mu\text{g EAG g}^{-1} \text{ MF}$) (MCCUE et al., 2000).

Já na quantificação de flavonóides, misturou-se 0,5 ml do filtrado em 2,5 ml de etanol 99 % e adicionou-se 0,5 ml de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2 %, posteriormente, agitou-se em vórtex e incubou-se a mistura por 1 hora, no escuro e em temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 420 nm e o teor de flavonóides foi expresso em mg de equivalentes de quercetina por g de massa fresca ($\mu\text{g EQ g}^{-1} \text{ MF}$).

Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL). Para a atividade da FAL, amostras de tecido foliar (5 folíolos) foram homogeneizadas em tampão borato de sódio 25 mM (pH 8,8) contendo EDTA 1 mM e PVP (0,5 %). A solução obtida foi centrifugada a 20.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado.

A atividade enzimática foi determinada segundo Falcón et al. (2008), com adaptações. Como substrato, foi utilizada fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Em 450 μL do substrato, foram adicionados 50 μL do extrato protéico e a mistura incubada a 40 °C por 1h. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 min. Posteriormente, 300 μL de

água destilada foram adicionados e a absorbância da solução final mensurada a 290 nm. Os resultados foram expressos como nmol de ácido *trans*-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação (nmol ácido *trans*-cinâmico mg proteína⁻¹ min⁻¹).

Dosagem de proteína total. O método de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras coletadas, com a utilização do reagente “coomassie brilliant blue” (CBB). As leituras de absorbância das soluções foram realizadas através de um espectrofotômetro a 595 nm. Posteriormente, foi realizada a conversão dos valores de absorbância em concentração de proteína solúvel. Esta conversão foi feita por comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de soro bovino (BSA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efeito de polissacarídeos sobre a severidade da mancha bacteriana do tomateiro

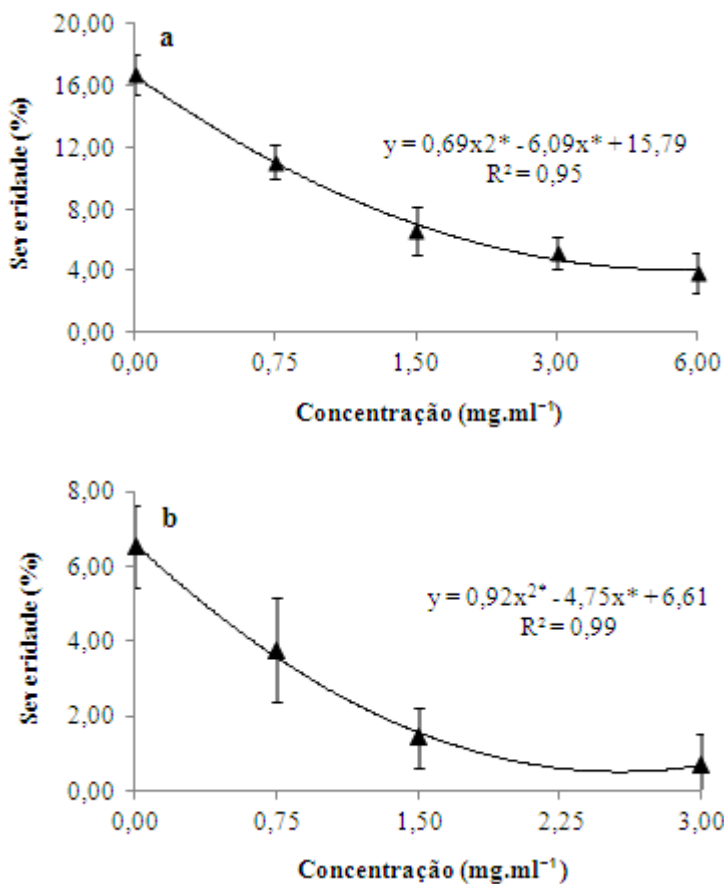
Efeito de doses polissacarídicas sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas cultivadas a uma temperatura média de 19,0 °C. O experimento relacionado ao efeito de concentrações de polissacarídeos sobre a severidade da mancha bacteriana do tomateiro foi repetido duas vezes sob condições ambientais similares. Desta forma, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, com temperatura ao redor de 19 °C.

Em todos os experimentos, observou-se um efeito de doses dos polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB) sobre a severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate inoculadas com *X. gardneri* (DO: 0,6 abs; 600nm) 4 dias após a aplicação dos tratamentos (água destilada, controle negativo; PB em diferentes concentrações; ASM a 25 µg.ml⁻¹, controle positivo).

A menor concentração utilizada de PB (0,75 mg.ml⁻¹) promoveu, em média, uma redução da severidade da doença de 38,2 % (FIGURAS 3a e 3b). As maiores doses (1,5 mg.ml⁻¹, 3,0 mg.ml⁻¹ e 6,0 mg.ml⁻¹), no primeiro ensaio realizado, foram capazes de reduzir aproximadamente 69,0 % em relação à testemunha (FIGURA 3a.). Já no segundo experimento, a redução da severidade provocada pelas maiores doses (1,5 mg.ml⁻¹ e 3,0 mg.ml⁻¹) foi de 83,8 % (FIGURA 3b). O ASM (25 µg.ml⁻¹), indutor de resistência comercial registrado para o tomateiro,

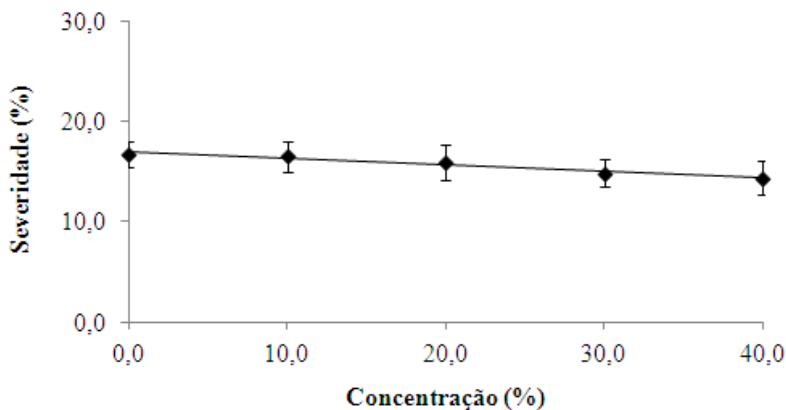
em todos os ensaios diminuiu os sintomas da mancha em aproximadamente 95,0 %.

FIGURA 3. Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) em plantas de tomate tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB) (0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação, em dois experimentos independentes (a e b). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p < 0,05). * Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %



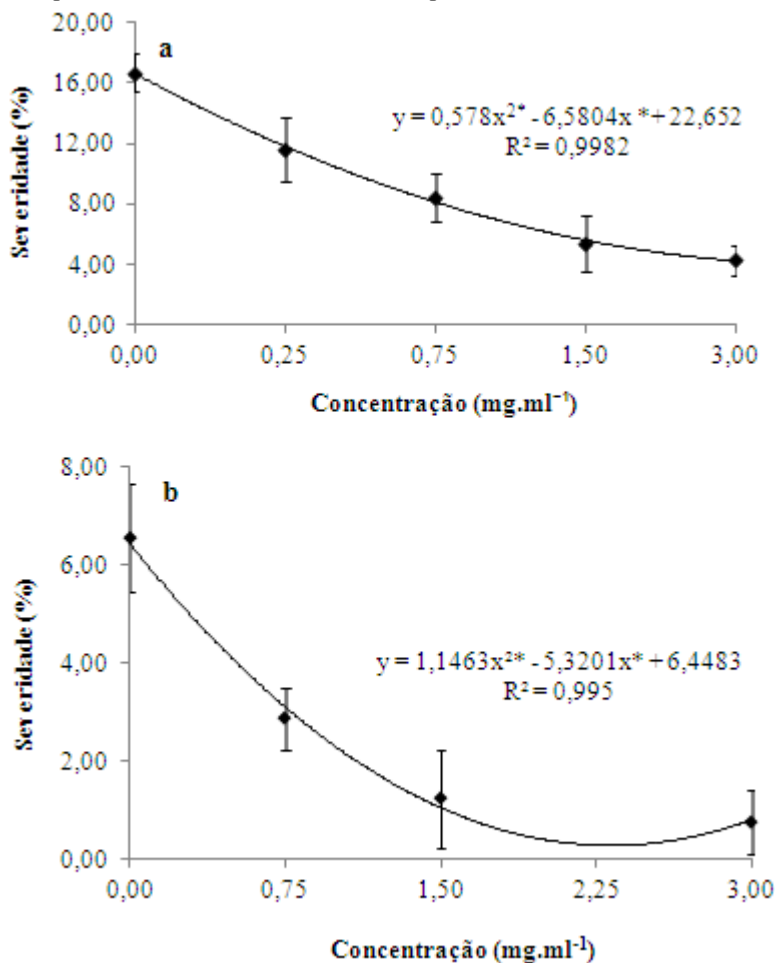
Apesar dos polissacarídeos da babosa diminuírem a severidade da mancha bacteriana, observou-se que o parênquima de reserva da babosa bruto, diluído em água destilada (GEL) não foi capaz de promover uma redução significativa da doença. Todas as concentrações testadas não diferiram estatisticamente da testemunha, não se observando um efeito de doses (FIGURA 4).

FIGURA 4. Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) em plantas de tomate tratadas com concentrações do parênquima de reserva da babosa (GEL) (0; 10; 20; 30; 40 %). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação. Não foi observado um efeito significativo de doses de acordo com o teste F ($p < 0,05$). Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %



Além de PB, também observou-se a eficiência de goma xantana (GOMA) na redução dos sintomas provocados pela *X. gardneri* em plantas de tomate. Todas as doses aplicadas, 4 dias antes da inoculação com o patógeno, foram capazes de diminuir a doença, porém as concentrações $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ e $3,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ foram as que alcançaram maiores níveis de controle, reduzindo em média 71,2 % da severidade da mancha em relação à testemunha, no primeiro ensaio (FIGURA 5a), e 84,6 % no segundo (FIGURA 5b), semelhante ao resultado obtido com a aplicação de ASM (25 µg.ml^{-1}).

FIGURA 5. Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) em plantas de tomate tratadas com concentrações de goma xantana (GOMA) (0; 0,25; 0,75; 1,5; 3,0 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas de tomate 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação, em dois experimentos independentes (a e b). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F ($p < 0,05$). *Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %

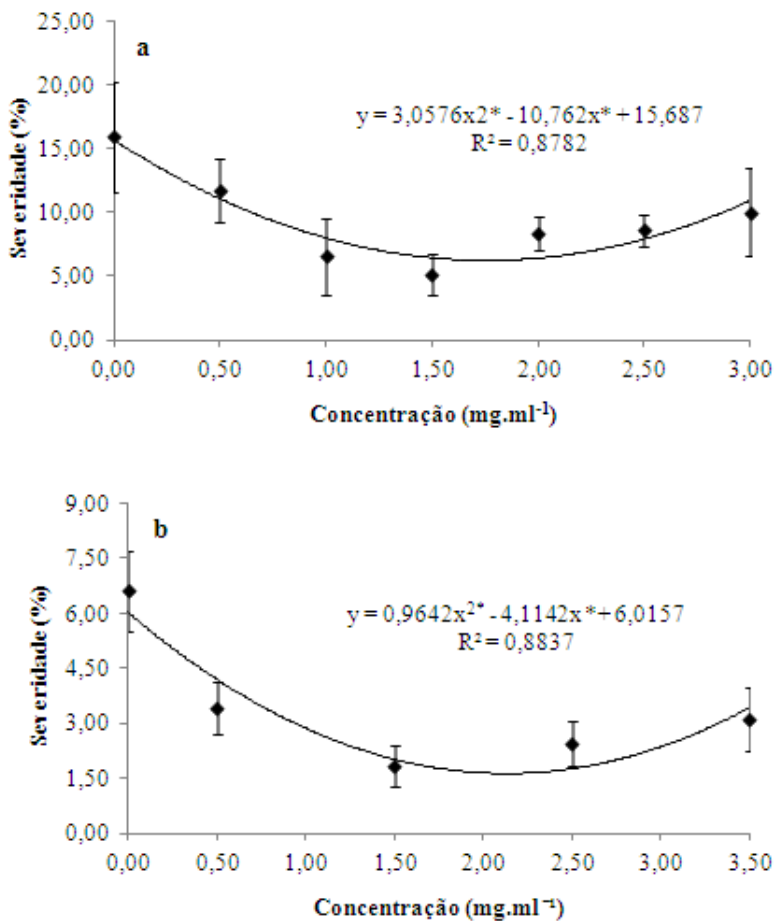


Ainda que a GOMA tenha reduzido a severidade da mancha bacteriana, observou-se uma fitotoxidez em plantas de tomate tratadas

com esse polissacarídeo. Quanto maior a concentração aplicada, maior foi o nível de toxidez observado.

Nos ensaios referentes ao efeito dos polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX), visando o controle da mancha bacteriana do tomateiro, observou-se diferença estatística entre os tratamentos. A doença nas plantas tratadas com PX, no primeiro ensaio, mostrou-se em média 47,1 % menor que a das plantas testemunhas, sendo que a dose 1,5 mg.ml⁻¹ foi a que apresentou menores valores para a severidade (FIGURA 6a). Já no segundo experimento, em média a severidade apresentou-se 59,1 % menor que o da testemunha, e a concentração 1,5 mg.ml⁻¹ também levou a uma maior redução da doença, diminuindo 72,2 % a severidade da mancha com relação às plantas tratadas com água destilada (FIGURA 6b). Doses acima de 1,5 mg.ml⁻¹ não proporcionaram aumento nos níveis de controle, resultando em porcentagens de redução de severidade inferiores às obtidas com a aplicação desta concentração.

FIGURA 6. Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) em plantas de tomate tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) (0,0,5; 0,75; 1,5; 3,0; 3,5 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 10 dias após a inoculação, em dois experimentos independentes (a e b). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p < 0,05). * Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,7 %.



Efeito de intervalos de tempo entre tratamento e inoculação sobre a severidade da mancha bacteriana do tomateiro em plantas cultivadas a uma temperatura média de 26°C. Após a verificação da melhor concentração dos polissacarídeos para o controle da bacteriose em tomateiro, efetuou-se um ensaio para a determinação do melhor intervalo de tempo entre o tratamento das plantas de tomate e a inoculação das mesmas com a *X. gardneri* (6, 4 ou 2 dias), a uma temperatura média de 26 °C.

Neste caso, a ANOVA fatorial para polissacarídeos e intervalos acusou interação entre as variáveis. Os polissacarídeos PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) e PX (1,5 mg.ml⁻¹), quando aplicados 2 ou 4 dias antes da introdução do patógeno, foram eficientes no controle da doença, porém essa eficiência foi drasticamente reduzida no intervalo de 6 dias (TABELA 1). O ASM foi efetivo na redução da doença quando aplicado aos 2, 4 ou 6 dias antes da inoculação, diminuindo em média 93 % a severidade da mancha.

TABELA 1. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamento com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação com *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm) sobre a severidade (%) da mancha bacteriana. Severidade média em plantas tratadas com ASM = 0,67 %.

Tratamentos/ Intervalos (Dias)	Severidade (%)		
	2 dias	4 dias	6 dias
Água destilada	12,5 ± 2,4 Aa *	7,3 ± 3,1 Ba	8,9 ± 2,9 ABa
PB (1,5 mg/ml)	1,3 ± 1,0 Ab	2,1 ± 1,0 Ab	8,4 ± 3,4 Ba
Goma (1,5 mg/ml)	1,9 ± 1,3 Ab	2,9 ± 1,2 Ab	9,0 ± 1,3 Ba
PX (1,5 mg/ml)	1,1 ± 0,7 Ab	1,3 ± 0,7 Ab	8,8 ± 1,1 Ba

*Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey. Os dados foram transformados em raiz quadrada.

2.3.2 Efeito de polissacarídeos sobre o crescimento *in vitro* de *X. gardneri*

A ANOVA fatorial para polissacarídeos e concentrações acusou interação entre os fatores analisados (TABELA 2). PB e GOMA não promoveram uma redução significativa do crescimento *in vitro* das colônias de *X. gardneri* em todas as doses testadas. A maior

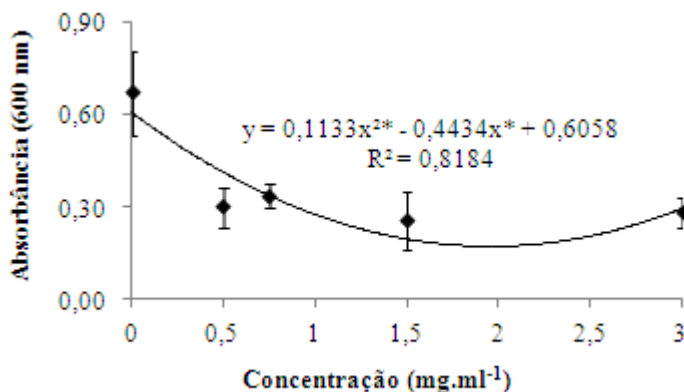
concentração de PB ($3,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) conferiu uma redução de 37,3 % sobre o crescimento bacteriano e, as demais, apenas 7,0 %, sem significância estatística. Já os PX foram capazes de diminuir significativamente o crescimento da bactéria, levando uma redução média de 56,0 % em relação à testemunha (FIGURA 7).

TABELA 2. Efeito de concentrações (0; 0,5; 0,75; 1,5; $3,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) e polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) sobre o crescimento *in vitro* da *Xanthomonas gardneri*.

Tratamentos/Doses	Absorbância (DO a 600 nm)				
	$0,00 \text{ mg.ml}^{-1}$	$0,50 \text{ mg.ml}^{-1}$	$0,75 \text{ mg.ml}^{-1}$	$1,50 \text{ mg.ml}^{-1}$	$3,00 \text{ mg.ml}^{-1}$
PB	$0,67 \pm 0,14 \text{ Aa}^*$	$0,64 \pm 0,23 \text{ Aa}$	$0,63 \pm 0,17 \text{ Aa}$	$0,60 \pm 0,12 \text{ Aa}$	$0,42 \pm 0,1 \text{ Aab}$
GOMA	$0,67 \pm 0,14 \text{ Aa}$	$0,66 \pm 0,14 \text{ Aa}$	$0,74 \pm 0,2 \text{ Aa}$	$0,57 \pm 0,15 \text{ Aa}$	$0,70 \pm 0,16 \text{ Aa}$
PX	$0,67 \pm 0,14 \text{ Aa}$	$0,30 \pm 0,07 \text{ Bb}$	$0,34 \pm 0,04 \text{ Bb}$	$0,26 \pm 0,09 \text{ Bb}$	$0,28 \pm 0,05 \text{ Bb}$

*Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey. Os dados foram transformados em raiz quadrada.

FIGURA 7. Efeito de concentrações de polissacarídeos extraídos *X. gardneri* (PX) sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas gardneri*. * Significativo a 5 % de probabilidade.



2.3.3 Reação de hipersensibilidade em plantas de tomate tratadas com diferentes polissacarídeos e inoculados com *X. gardneri*.

O número de células apresentando reação de hipersensibilidade ou acúmulo de peróxido de hidrogênio/cm², 24 horas após a aplicação dos tratamentos (Água destilada, PB 1,5 mg.ml⁻¹, GOMA 1,5 mg.ml⁻¹ ou PX 1,5 mg.ml⁻¹) e 24 horas após a inoculação dos tomateiros com *X. gardneri*, é encontrada na TABELA 3 e na FIGURA 8.

Não foram observadas células epidérmicas com acúmulo de peróxido de hidrogênio ou reação de hipersensibilidade 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Contudo, verificou-se um número elevado de células do mesófilo com acúmulo desta espécie ativa de oxigênio em plantas tratadas com GOMA (1,5 mg.ml⁻¹), mesmo antes da inoculação do patógeno (TABELA 3).

Após 120 horas da aplicação dos tratamentos e 24 horas da inoculação, observou-se que as plantas pulverizadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹) acumularam peróxido de hidrogênio apenas em células do mesófilo. Já a GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) foi capaz de promover o acúmulo tanto em células da epiderme como do mesófilo, porém não chegou a apresentar células com reação de hipersensibilidade.

As plantas tratadas com polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) a 1,5 mg.ml⁻¹ apresentaram células epidérmicas com acúmulo de peróxido de hidrogênio significativamente maior que nas testemunhas. Neste tratamento foi possível verificar células com reação de hipersensibilidade.

FIGURA 8. Células foliares de tomateiro, 24h após a inoculação com *X. gardneri*: células do mesófilo de plantas de tomate tratadas com água destilada (A), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB a 1,5 mg.ml⁻¹ (B) ou goma xantana - GOMA a 1,5 mg.ml⁻¹ (C); acúmulo de peróxido de hidrogênio foi observado em (B) e (C). Células epidérmicas de tomateiro, tratado com polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (1,5 mg.ml⁻¹), apresentando reação de hipersensibilidade (D). Barras = 10μm

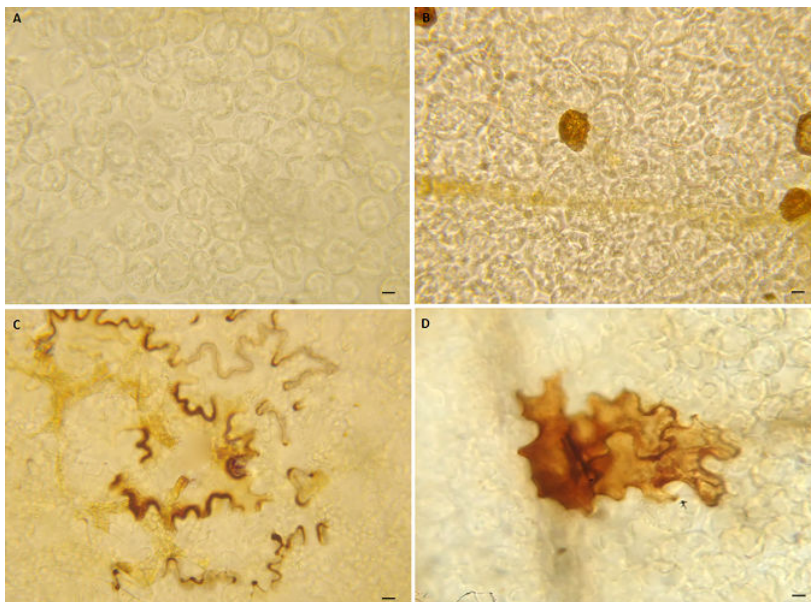


TABELA 3. Número de células com reação de hipersensibilidade ou com acúmulo de peróxido de hidrogênio/cm² no mesofilo e na epiderme foliar de plantas de tomate tratadas com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e inoculadas com *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm).

24 horas após tratamento			24 horas após inoculação		
Tratamento	Acúmulo no mesofilo		Acúmulo no mesofilo		
Água destilada	20,2 ± 6,6 Aa*		15,2 ± 4,8 Aa		
PB (1,5 mg.ml ⁻¹)	27,4 ± 3,6 Aa		51,1 ± 4,6 Bb		
GOMA (1,5 mg.ml ⁻¹)	213,1 ± 6,0 Ab		156,9 ± 4,3 Bc		
PX (1,5 mg.ml ⁻¹)	18,5 ± 5,1 Aa		15,0 ± 5,3 Ba		
Tratamento	Acúmulo epitelial		Acúmulo epitelial		
Água destilada	0,0 Aa*		0,0 Aa		
PB (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,0 Aa		0,0 Aa		
GOMA (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,0 Aa		55,9 ± 4,8 Bb		
PX (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,0 Aa		74,4 ± 5,3 Bc		
Tratamento	Células com RH		Células com RH		
Água destilada	0,0		0,0		
PB (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,0		0,0		
GOMA (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,0		0,0		
PX (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,0		2,7 ± 1,9		

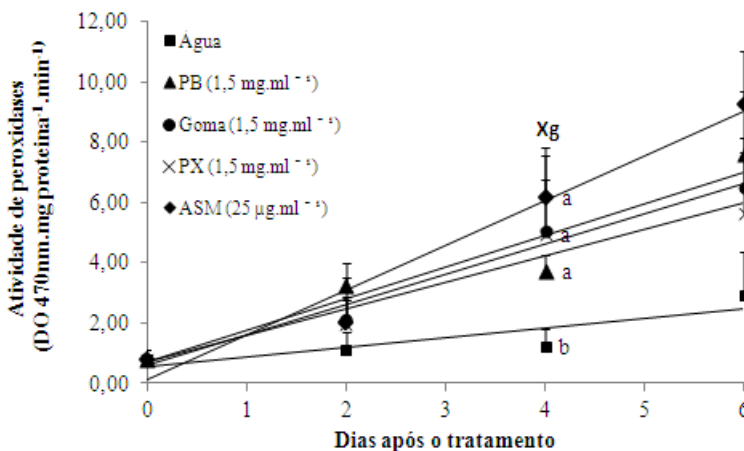
*Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

2.3.4 Análises bioquímicas realizadas com plantas de tomate

Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas após a aplicação dos polissacarídeos, sob uma temperatura média de 24,5 °C. Após 2 dias da aplicação dos tratamentos (água destilada, PB 1,5 mg.ml⁻¹, GOMA 1,5 mg.ml⁻¹, PX 1,5 mg.ml⁻¹ ou ASM 25µg.ml⁻¹) sobre os tomateiros, evidenciou-se que apenas as plantas tratadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹) apresentaram uma alta atividade de peroxidases. Os demais polissacarídeos e o ASM (25 µg/ml), indutor de resistência comercial, não levaram ao aumento da atividade desta enzima no tempo mencionado, não diferindo estatisticamente da testemunha.

Porém, 4 dias após a pulverização dos tomateiros, momentos antes da inoculação, observou-se que as plantas tratadas com PB, GOMA ou PX a $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ apresentaram atividade de peroxidase 3, 4,2 e 4,1 vezes maiores que a da testemunha, respectivamente. No sexto dia, a atividade de peroxidases em plantas tratadas com polissacarídeos manteve a mesma tendência. Resultados semelhantes foram observados neste mesmo período em plantas tratadas com ASM (FIGURA 9).

FIGURA 9. Atividade de peroxidases em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■; $y = 0,33x^* + 0,54$; $R^2 = 0,76$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa – PB (▲; $y = 1,0489x^* + 0,70$; $R^2 = 0,92$), goma xantana - GOMA (●; $y = 1,0x^* + 0,61$; $r^2 = 0,98$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* – PX (×; $y = 0,88x^* + 0,71$; $R^2 = 0,95$) ou acibenzolar-s-metil - ASM (◆; $y = 1,48x^* + 0,13$; $r^2 = 0,96$). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. *Significativo a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$).

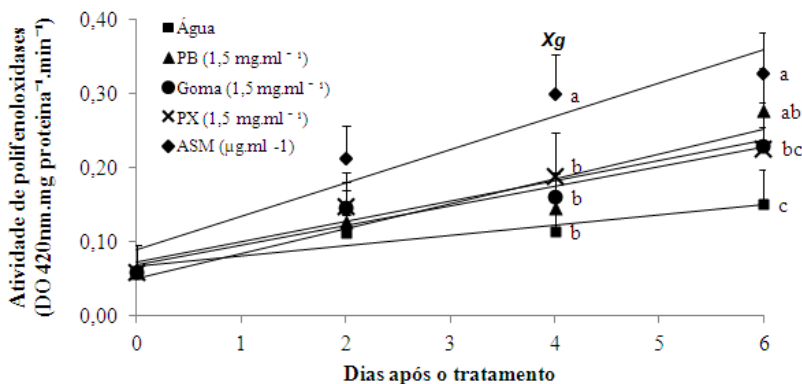


Não foi observada uma alteração significativa na atividade de polifenoloxidasas em tomateiros após 2 dias da aplicação dos tratamentos sobre as plantas. As suspensões polissacarídicas pulverizadas não diferiram estatisticamente da testemunha durante este período. O mesmo comportamento foi observado momentos antes da inoculação, com exceção do ASM (25 µg.ml^{-1}) que conferiu um

aumento significativo da atividade desta enzima 4 dias após o tratamento das plantas.

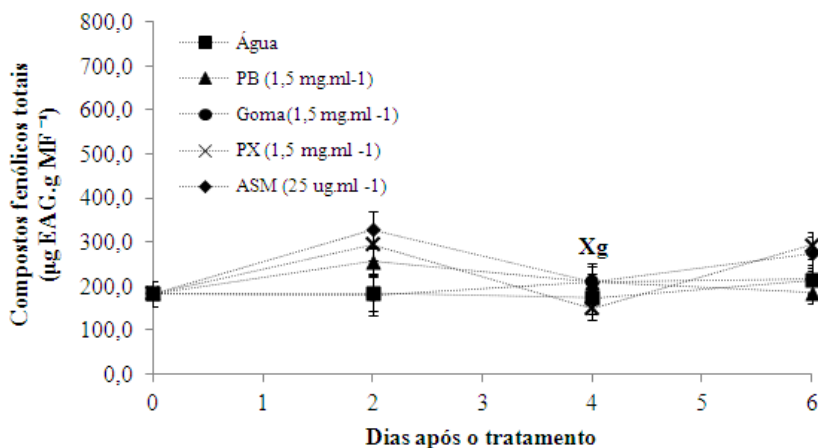
Passados 6 dias da pulverização dos tomateiros, observou-se que apenas o PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) e o ASM foram capazes de interferir na atividade de polifenoloxidasas, aumentando em média 2 vezes a atividade enzimática em relação à testemunha (FIGURA 10).

FIGURA 10. Atividade de polifenoloxidasas em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■; $y = 0,01x^* + 0,07$; $R^2 = 0,89$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa – PB (▲; $y = 0,03x^* + 0,05$; $R^2 = 0,91$), goma xantana – GOMA (●; $y = 0,026x^* + 0,07$; $r^2 = 0,94$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (×; $y = 0,03x^* + 0,07$; $R^2 = 0,95$) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆; $y = 0,05x^* + 0,09$; $R^2 = 0,91$). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorvância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. *Significativo a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$).



Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides após aplicação dos polissacarídeos. Em experimento para a análise do conteúdo de compostos fenólicos totais em folhas de tomateiro, verificou-se que o mesmo permaneceu praticamente constante até o sexto dia após a aplicação da água destilada, PB $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, GOMA $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, PX $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ou ASM $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Sendo assim, não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos adotados, mesmo após a inoculação das plantas de tomate com a *X. gardneri* (FIGURA 11).

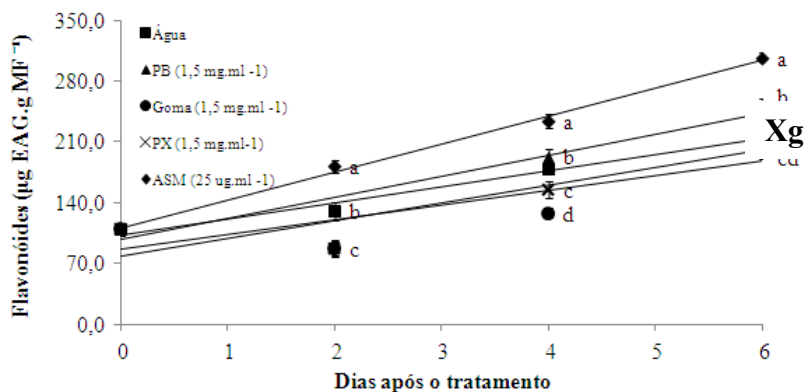
FIGURA 11. Conteúdo de compostos fenólicos em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲), goma xantana – GOMA (●); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (×) ou acibenzolar-s-metil – ASM (◆). O símbolo “Xg” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Resultados não significativos a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$).



Até o quarto dia após a aplicação dos tratamentos, o conteúdo de flavonóides em folhas de tomateiro tratadas com GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) e PX (1,5 mg.ml⁻¹) permaneceu significativamente menor que o conteúdo determinado em plantas tratadas com água destilada. Já o conteúdo de flavonóides em folhas tratadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹) não apresentou-se estatisticamente diferente da testemunha até este período (FIGURA 12).

Apesar das suspensões aplicadas sobre os tomateiros não afetarem na quantidade total de compostos fenólicos, observou-se que após 6 dias da pulverização dos tratamentos, as plantas submetidas a PB (1,5 mg.ml⁻¹) e ASM (25 µg.ml⁻¹), apresentaram conteúdo de flavonóides significativamente maior que o da testemunha, aumentando em média 19,05 % dos valores observados em relação às plantas tratadas com água destilada.

FIGURA 12. Conteúdo de flavonóides em folhas de tomateiro tratadas com água destilada (■; $y = 18,56x + 103,29$; $R^2 = 0,98$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲; $y = 24,22x + 98,14$; $R^2 = 0,96$), goma xantana - GOMA (●; $y = 20,63x + 77,84$; $R^2 = 0,68$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (×; $y = 16,96x + 86,80$; $R^2 = 0,76$) ou acibenzolar-S-metil - ASM (◆; $y = 32,22x + 111,29$; $R^2 = 0,99$). O símbolo "Xg" indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. *Significativos a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$).



Efeito do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação sobre a atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase a uma temperatura média de 19,2 °C. A ANOVA fatorial não acusou interação entre tratamentos (água destilada; PB 1,5 mg.ml⁻¹; GOMA 1,5 mg.ml⁻¹; PX 1,5 mg.ml⁻¹ e ASM 25 µg.ml⁻¹) e intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) nos ensaios referentes à determinação da atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liases em folhas de tomateiro. As análises mostraram diferença estatística apenas entre os tratamentos aplicados.

O aumento da atividade de peroxidases em plantas tratadas e não inoculadas foi evidenciado em plantas expostas à PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) e PX (1,5 mg.ml⁻¹). Porém, este incremento foi ainda mais pronunciado em tomateiros tratados e posteriormente inoculados com o agente patogênico da mancha bacteriana. Em média, os polissacarídeos foram capazes de aumentar 2,2 vezes a atividade desta enzima após a inoculação em relação à testemunha. Resultados

semelhantes foram observados em plantas tratadas com ASM ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (TABELA 4).

TABELA 4. Efeito do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de tomateiros com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação das plantas com *Xanthomonas gardneri* sobre a atividade de peroxidases ($\text{DO } 470 \text{ nm.mg proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Os dados foram transformados em raiz quadrada.

Tratamento/Intervalo (Dias)	Plantas tratadas e não inoculadas			
	2 dias	4 dias	6 dias	$\bar{\Sigma}$
Água destilada	$0,6 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,3$	0,6 A*
PB ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$1,3 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,9$	1,5 C
GOMA ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$3,6 \pm 1,1$	$2,0 \pm 0,7$	$3,4 \pm 1,1$	3,0 D
PX ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$1,0 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,4$	1,0 BC
ASM ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	$0,5 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,3$	0,8 AB

Tratamento/Intervalo (Dias)	Plantas tratadas e inoculadas			
	2 dias	4 dias	6 dias	$\bar{\Sigma}$
Água destilada	$1,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	1,1 A*
PB ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$2,5 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,6$	2,4 B
GOMA ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$2,6 \pm 1,0$	$3,3 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,7$	2,8 B
PX ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$1,8 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0,7$	$2,2 \pm 0,7$	2,0 B
ASM ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	$3,0 \pm 0,8$	$2,5 \pm 1,0$	$2,8 \pm 0,7$	2,8 B

*Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

A atividade de polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liases, em plantas de tomate, não foi alterada pela aplicação de PB $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, GOMA $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, PX $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ou pelo indutor de resistência comercial antes da inoculação da *X. gardneri*, independente do intervalo de tempo avaliado. Contudo, a elicitação destes mecanismos de defesa foi evidenciada após a introdução do patógeno em tomateiros tratados com os polissacarídeos. Em média, após a inoculação, as atividades de polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liases aumentaram 1,8 e 1,4 vezes em relação à testemunha, respectivamente (TABELAS 5 e 6).

TABELA 5. Efeito do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de tomateiros com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação das plantas com *Xanthomonas gardneri* sobre a atividade de polifenoloxidasas (do 420 nm.mg proteína⁻¹.min⁻¹). Os dados foram transformados em raiz quadrada

Tratamento/Intervalo (Dias)	Plantas tratadas e não inoculadas			
	2	4	6	$\bar{\Sigma}$
Água destilada	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,12
PB (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,11
Goma (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,09	0,13
PX (1,5 mg.ml ⁻¹)	0,15 ± 0,06	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,13
ASM (25 µg.ml ⁻¹)	0,11 ± 0,08	0,15 ± 0,09	0,11 ± 0,018	0,12

Tratamento/ Intervalo (Dias)	Plantas tratadas e inoculadas			
	2	4	6	$\bar{\Sigma}$
Água destilada	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,08 A *
PB (1,5 mg/ml)	0,10 ± 0,03	0,15 ± 0,09	0,17 ± 0,04	0,14 B
Goma (1,5 mg/ml)	0,20 ± 0,09	0,16 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,16 B
PX (1,5 mg/ml)	0,12 ± 0,06	0,17 ± 0,09	0,12 ± 0,04	0,14 B
ASM (25 mg/L)	0,10 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,14 B

*Letras diferentes indicam diferença sinificativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

TABELA 6. Efeito do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de tomateiros com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação das plantas com *Xanthomonas gardneri* sobre a atividade de fenilalanina amônia-liases (nmol ácido trans-cinâmico mg proteína⁻¹ min⁻¹).

Tratamento/Intervalo (Dias)	Plantas tratadas e não inoculadas			
	2	4	6	$\bar{\Sigma}$
Água destilada	6,0 ± 0,4	6,0 ± 1,5	6,0 ± 0,6	6,0
PB (1,5 mg/ml)	6,7 ± 1,5	6,3 ± 1,9	6,6 ± 0,6	6,0
Goma (1,5 mg/ml)	7,4 ± 1,7	6,8 ± 0,6	6,2 ± 1,1	6,8
PX (1,5 mg/ml)	7,6 ± 1,5	7,1 ± 0,9	5,5 ± 1,7	6,7
ASM (25 mg/L)	7,1 ± 1,0	6,0 ± 0,9	5,8 ± 1,4	6,3

Tratamento/(Intervalo (Dias)	Plantas tratadas e inoculadas			
	2	4	6	$\bar{\Sigma}$
Água destilada	9,2 ± 1,4	8,9 ± 1,3	8,6 ± 1,8	8,9 A *
PB (1,5 mg/ml)	14,1 ± 1,9	14,1 ± 1,9	12,3 ± 2,3	13,7 C
Goma (1,5 mg/ml)	13,2 ± 1,7	11,4 ± 1,8	9,6 ± 1,9	11,4 BC
PX (1,5 mg/ml)	11,5 ± 2,6	12,3 ± 2,7	11,3 ± 1,2	11,7 BC
ASM (25 mg/L)	9,2 ± 2,9	9,5 ± 0,6	12,8 ± 1,4	10,5 AB

*Letras diferentes indicam diferença sinificativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

Após a coleta das amostras foliares para análises bioquímicas, efetuou-se uma avaliação da severidade da mancha bacteriana nas plantas amostradas. A 19,2°C e em dias curtos, os polissacarídeos foram eficientes no controle da mancha bacteriana em todos os intervalos testados (2, 4 e 6 dias), mantendo a severidade, em média, 66,2 % menor que a alcançada com a aplicação da água destilada em diferentes intervalos de tempo entre tratamento e inoculação. O ASM reduziu a mancha em 86,4 %, com relação à testemunha (TABELA 7).

TABELA 7. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamento com água destilada, polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) ou polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) e a inoculação com *Xanthomonas gardneri* (DO 0,6 unidades de absorbância a 600 nm) sobre a severidade (%) da mancha bacteriana.

Tratamento/ intervalo (Dias)	Severidade (%)		
	2	4	6
Água destilada	14,9 ± 3,6 Aa *	15,8 ± 2,8 Aa	13,0 ± 3,5 Aa
PB (1,5 mg.ml ⁻¹)	5,7 ± 1,2 Ab	5,1 ± 2,8 Ab	3,2 ± 0,8 Ab
Goma (1,5 mg.ml ⁻¹)	7,0 ± 1,3 Abc	1,7 ± 1,2 Bb	5,2 ± 1,4 ABb
PX (1,5 mg.ml ⁻¹)	5,3 ± 1,2 Ab	4,3 ± 2,8 Ab	6,7 ± 1,4 Ab
ASM (25 µg.ml ⁻¹)	2, 3 ± 1,4 Ab	2,2 ± 1,2 Ab	1,4 ± 0,7 Abc

Plantas tratadas e inoculadas com *X. gardneri*; *Letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença sinificativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se um efeito de concentrações dos polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB) sobre a severidade da mancha bacteriana. Porém, verificou-se que PB a 3,0 mg.ml⁻¹ e 6,0 mg.ml⁻¹ formaram uma suspensão polissacarídica viscosa, de difícil aplicação sobre as plantas. Isto significa que as doses elevadas, mesmo promovendo um maior controle da moléstia, podem apresentar problemas no momento da sua aplicação a campo. Por isso, julgou-se como ótima a concentração 1,5 mg.ml⁻¹.

Apesar da eficiência de PB em controlar a mancha bacteriana, observou-se que o parênquima de reserva da babosa (GEL) não foi capaz de reproduzir o mesmo efeito, demonstrando que as moléculas polissacarídicas responsáveis pela redução da severidade da doença não estão em concentrações suficientes no GEL para promoverem a diminuição dos sintomas provocados pela *X. gardneri*, conforme o observado em experimento anterior.

A babosa é uma planta medicinal que possui inúmeras propriedades regeneradoras, curativas, lubrificantes, nutritivas e antimicrobianas, constituindo uma rica fonte de polissacarídeos e metabólitos secundários. As folhas desta planta podem ser usadas para se obter uma fração líquida rica em compostos fenólicos e um parênquima de reserva mucilaginoso constituído majoritariamente por polissacarídeos, dentre esses a acemanana, principal substância ativa da

planta. Este polissacarídeo é um polímero misto de mananas acetiladas, com cadeias de tamanhos variáveis, formadas por resíduos de manose e glucose unidos por ligações do tipo β -1,4 (FEMENIA et al., 1999; REYNOLDS; DWECK, 1999; SURJUSHE; VASANI; SAPLE, 2008; CARPANO; CASTRO; SPEGAZZENI, 2009).

A molécula de acemanana é muito semelhante à da quitosana, que é um polissacarídeo linear, constituído por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranoose (glucosamina) e 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranoose (acetilglucosamina) unidas por ligações glicosídicas β -1,4. A quitosana, extraída da carapaça de crustáceos e da parede celular de alguns fungos, têm mostrado eficiência no controle de doenças vegetais, tanto através da elicitação de mecanismos de defesa da planta, quanto através da ação antimicrobiana (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; PILLAI; WILLI; SHARMA, 2009).

Yafei et al. (2009) observaram que, em plantas de fumo tratadas com oligoquitosana, o nível de expressão do mRNA de β -1-3 glucanases foi 11 vezes maior e a severidade do vírus TMV foi significativamente menor em relação às plantas testemunhas. Coqueiro (2010) observou que a quitosana é capaz de promover uma proteção de tomates contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) na ordem de 67 %, de induzir as plantas a sintetizarem diferentes classes de compostos em resposta à fitobactéria e, além disso, de atuar diretamente sobre o agente patogênico. Sendo assim, devido ao fato da babosa possuir um parênquima de reserva rico em acemanana, sugere-se que os PB aplicados sobre o tomateiro possam estar reduzindo a severidade da mancha bacteriana através de mecanismos semelhantes aos desencadeados pela quitosana.

Alguns autores já observaram a capacidade elicitora e antimicrobiana da babosa. Stangarlin et al. (1999), por exemplo, ao investigarem a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja, quando submetidos a diferentes extratos de plantas, observaram que o de babosa induziu a síntese de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas em sorgo. Segundo Uzma, Hassan e Naseem (2011), o gel da babosa (0,35 %) é capaz de reduzir o crescimento micelial de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium digitatum* e de inibir completamente o crescimento *in vitro* de *Drechslera hawaiiensis* e *Alternaria alternata*.

Além dos compostos extraídos a partir de vegetais, como a babosa, existem aqueles presentes em microrganismos que também possuem atividade biológica e que são capazes de controlar doenças de plantas. A partir de moléculas microbianas, pesquisas têm sido

realizadas e o desenvolvimento de produtos comerciais tem sido alcançado. O Messenger, por exemplo, foi produzido através da transformação de *Escherichia coli* K-12, que recebeu o fragmento de DNA que codifica a proteína harpina de *E. amylovora*. Essa proteína, ingrediente ativo do produto, é essencial para a bactéria causar doenças em espécies vegetais compatíveis, mas torna-se uma molécula elicitadora de defesas capaz de controlar moléstias de mais de 40 culturas não hospedeiras, como por exemplo, de algodão, trigo, pepino, citrúrus, fumo, morango, tomate e pimentão (ROMEIRO; GARCIA, 2007). A goma xantana é outro exemplo de molécula proveniente de microrganismo capaz de elicitar mecanismos de defesa em vegetais e de controlar a severidade de doenças de plantas.

Neste trabalho, observou-se que a goma xantana foi eficiente na redução da mancha bacteriana do tomateiro em todas as doses testadas. Tratando-se de um exopolissacarídeo capsular, característico da bactéria *X. campestris* pv. *campestris*, patógeno de brássicas, a goma xantana tem a função de proteger a célula bacteriana contra intempéries do ambiente, como variações de temperatura e umidade, e de aderir-la a superfícies e substratos. Além disso, esse exopolissacarídeo está intimamente ligado à compatibilidade entre hospedeiros e patógenos, sendo importante para aparecimento dos sintomas da doença sobre a planta (ONSANDO, 1992). Por isso, acredita-se que os mesmos podem atuar de forma similar à harpina, que é uma proteína essencial para a bactéria *E. amylovora* causar doenças em determinadas plantas, mas torna-se uma molécula elicitadora de defesas em espécies não hospedeiras.

A eficiência da goma xantana em controlar doenças vegetais e ativar mecanismos de defesa de plantas já foi documentada. Castro e Bach (2004) e Antoniazzi et al. (2008) demonstraram o potencial do exopolissacarídeo como indutor de resistência em cevada contra *Bipolaris sorokiniana*, em diferentes intervalos de tempo entre administração do indutor e a inoculação do patógeno. Resultados como estes demonstram que a goma xantana pode realmente atuar como uma molécula elicitadora em determinados vegetais não hospedeiros e, assim, levar à redução da severidade de doenças fitopatogênicas. Além da goma xantana e da harpina, a elicitação de mecanismos de defesa vegetal através da aplicação de outras moléculas provenientes de microrganismos patogênicos também já foi evidenciada por pesquisadores. Romeiro e Kimura (1997), por exemplo, demonstraram que glicoproteínas, exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, diluídos em água destilada (1 mg.mL⁻¹), e aplicados em plantas de pimentão 72 h antes da inoculação com o

mesmo patógeno, foram capazes de induzir resistência no vegetal. Estes resultados concordam com os obtidos no presente trabalho, onde polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) foram capazes de elicitar respostas de defesa em plantas de tomate contra o próprio agente patogênico.

Para a extração dos polissacarídeos da *Xanthomonas gardneri* (PX), submeteu-se a bactéria à inativação térmica. Por isso, acredita-se que neste procedimento tenha ocorrido a liberação de moléculas elicitoras e antimicrobianas. Segundo Bach, Barros e Kimati (2003), fitopatógenos, quando inativados termicamente, podem liberar moléculas elicitoras e podem ser capazes de proteger determinadas plantas contra o próprio microrganismo patogênico. Essas moléculas elicitoras, por sua vez, podem ser de origem polissacarídica, pois, de acordo com Boller (1995), os oligossacarídeos são precursores de sinais reconhecidos por células vegetais, que induzem o acúmulo das fitoalexinas e, consequentemente, a ativação de mecanismos de defesa da planta.

Bongiovani (2008) e Weiland e Guyonnet (2003), afirmam que a exposição de polissacarídeos à pH ácido e/ou a temperaturas elevadas, podem levar à liberação de mono e oligossacarídeos, modificando a característica inicial da molécula. Com isso, sugere-se que a autoclavagem da suspensão bacteriana, pode ter ocasionado ruptura de ligações que unem os monômeros dos polissacarídeos e consequente liberação de oligossacarídeos, que podem ter agido como elicitores, estimulando a síntese de compostos responsáveis pela indução de resistência e, consequentemente, ter reduzido a doença bacteriana do tomateiro.

A redução da severidade da mancha bacteriana foi evidenciada em plantas submetidas a PB, GOMA ou PX. Porém, de maneira geral, observou-se que a 26 °C e um fotoperíodo > 12 h todas as suspensões polissacarídicas testadas agiram por um curto período de tempo sobre as plantas de tomate contra a doença. Todavia, este experimento foi conduzido sob uma temperatura ideal para o desenvolvimento da bacteriose (temperatura média de 26 °C, nos meses de dezembro e janeiro), o que pode ter levado à superação das barreiras de defesa pelo agente patogênico no maior intervalo de tempo (6 dias). Essa hipótese foi fortalecida em experimentos posteriores, onde, a uma temperatura média de 19,2 °C e um fotoperíodo < 12 h, os polissacarídeos foram eficientes no controle da doença em todos os intervalos testados (2, 4 e 6 dias).

Segundo Agrios (1997), a infecção de patógenos e o desenvolvimento de moléstias são fatores diretamente influenciados pelas

condições ambientais, assim como os mecanismos de defesa vegetal, que podem ser superados por agentes patogênicos, dependendo das condições de cultivo da planta. Ou seja, se o vegetal está sendo mantido em condições favoráveis ao patógeno e desfavoráveis ao seu bom desenvolvimento, a ocorrência da doença fica mais eminente do que em condições onde o microrganismo está em desvantagem. Este processo de interação entre fatores (hospedeiro, patógeno e ambiente), que levam ao desencadeamento ou à supressão de moléstias, é conhecido como triângulo da doença. Por isso, sugere-se que PB, GOMA e PX são polissacarídeos capazes de induzir mecanismos de defesa vegetais e de garantir o controle da mancha bacteriana do tomateiro por períodos mais prolongados em condições ambientais desfavoráveis ao patógeno e favoráveis às plantas.

A ideia de que PB e GOMA atuam sobre as plantas de tomate contra a mancha bacteriana através da indução de resistência foi fortalecida quando observou-se que as suspensões desses polissacarídeos não foram capazes de reduzir significativamente o crescimento *in vitro* da *X. gardneri* mesmo em doses elevadas. Para Waksman (1959), determinada substância só é considerada antimicrobiana quando em baixas concentrações inibe o crescimento ou a multiplicação de microrganismos. Coqueiro (2010), em estudo semelhante, observou que os polissacarídeos do parênquima de reserva da babosa não apresentaram efeito inibitório sobre colônias do microrganismo nas concentrações de 1,5 e 3 mg.ml⁻¹, reforçando a hipótese de que PB não possui ação direta sobre o agente patogênico da mancha bacteriana.

Por outro lado, os polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) foram capazes de produzir um efeito direto significativo sobre a fitobactéria em estudo, reduzindo em média 56,0 % do seu crescimento. De acordo com Llorens, Tormo e Martinez-García (2010), moléculas danificadas, provenientes de bactérias, podem levar à restrição do desenvolvimento de novas colônias, inclusive do próprio microrganismo. Por isso, sugere-se que o efeito direto sobre a *X. gardneri*, provocado por PX, possa estar relacionado com a presença de moléculas danificadas da bactéria em PX. Este efeito direto sobre o agente causal da mancha bacteriana, por sua vez, pode ter contribuído para o controle da severidade da mancha bacteriana, verificada nos experimentos *in vivo*.

Sendo assim, propõe-se que as principais formas de ação de PX sobre plantas de tomate contra a mancha bacteriana foi a antimicrobiana e também a indução de resistência, pois estes polissacarídeos reduziram o

crescimento *in vitro* da *X. gardneri* e, assim como PB e GOMA, provocaram mudanças no metabolismo relacionado à defesa vegetal do tomateiro, como a reação de hipersensibilidade, aumento na atividade enzimática e mudanças nos teores de flavonóides.

A ativação dos mecanismos de defesa latentes do tomateiro, com a aplicação de PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) e PX (1,5 mg.ml⁻¹), foi evidenciada com a presença de células com acúmulo de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, além de participar do cruzamento oxidativo (*cross-linking*) de proteínas da parede celular, é um substrato das peroxidases na lignificação e pode atuar como um regulador da reação de hipersensibilidade, uma das mais eficientes formas de defesa das plantas. Este mecanismo, por sua vez, é caracterizado pela morte localizada das células da planta e a formação de lesões necróticas no sítio de penetração do microrganismo (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; IRITI; FAORO, 2003; KALOSHIAN, 2004; ZEIER, 2005; GONZÁLEZ et al., 2006).

A reação de hipersensibilidade exibida por plantas a fitobactérias incompatíveis tem como característica ser sempre necrótica, localizada e ocorrer com desencadeamento da área necrosada. Nesse processo, assim que a bactéria entra em contato com os tecidos do hospedeiro, as células ao redor do sítio de infecção entram em colapso e morrem rapidamente, formando as lesões necróticas, inicialmente microscópicas, que podem evoluir e formar lesões macroscópicas. Concomitantemente, há produção e acúmulo de substâncias tóxicas e pigmentos nesses tecidos, assim como alterações metabólicas e fisiológicas nas células. Em situações como esta, a bactéria chega a iniciar sua multiplicação, mas cessa-a bruscamente e morre, com isso, a infecção não progride e o desenvolvimento da doença é afetado (ROMEIRO, 2005).

A GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) foi capaz de levar ao acúmulo de espécies ativas de oxigênio em células do mesofilo de tomateiro mesmo antes da inoculação da planta com a *X. gardneri*. Como discutido anteriormente, a goma xantana, exopolissacarídeo capsular presente em células bacterianas, está intimamente relacionada com o reconhecimento do microrganismo pelo seu hospedeiro e vice e versa. Como a goma xantana utilizada é proveniente da *X. campestris* pv. *campestris*, bactéria não patogênica ao tomateiro, a aplicação da mesma sobre as plantas de tomate pode ter levado a uma reação de incompatibilidade, que é evidenciada com a reação de hipersensibilidade ou com o acúmulo de espécies ativas de oxigênio.

Ainda que a goma xantana tenha reduzido a severidade da mancha bacteriana, observou-se uma reação de hipersensibilidade

macroscópica em folhas de tomate tratadas com o polissacarídeo. Todas as doses da suspensão levaram ao aparecimento de lesões necróticas no limbo foliar e, quanto maior a concentração utilizada, maior foi a área afetada. Isto significa que, mesmo havendo a indução de resistência e a consequente redução da doença, os danos provocados em plantas de tomate, pela aplicação da goma, podem prejudicar a produtividade e desenvolvimento do vegetal.

Os demais polissacarídeos aplicados sobre as plantas de tomate, PB e PX, também provocaram um acúmulo de peróxido de hidrogênio em células do tecido foliar, porém não levaram a uma hipersensibilidade macroscópica. Além disso, esta explosão oxidativa ocorreu apenas após a inoculação da planta com o patógeno. Isto pode indicar que, inicialmente, os polissacarídeos levaram o tomateiro a um estado de alerta e, somente depois da inoculação, ativaram efetivamente os mecanismos de defesa.

Dentre as principais alterações decorrentes da reação de hipersensibilidade está a indução da produção de proteínas relacionadas à patogênese, como as peroxidases. Outras respostas paralelas à infecção são o aumento da expressão de fenilalanina amônia liase e deposição de lignina (VERBENE et al., 2000). Neste estudo, além da reação de hipersensibilidade, o aumento das atividades de enzimas como as peroxidases e fenilalanina amônia liase foi constatado em plantas tratadas com os polissacarídeos (PB, GOMA e PX).

Sob temperaturas mais elevadas (média de 24,5 °C) e fotoperíodo > 12 h, observou-se que o ASM (25 µg.ml⁻¹), indutor de resistência comercial, aumentou significativamente a atividade de peroxidases após 2 dias da aplicação do produto. Vários trabalhos identificaram o ASM como um potente indutor de resistência. Plantas de tomate tratadas com este produto comercial apresentaram redução significativa na severidade do cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, induzindo resistência na planta (KRONKA, 2004). Molinari e Baser (2010) afirmam que o ASM é capaz de ativar mecanismos de defesa em tomateiro e de reduzir significativamente os danos provocados por nematóides. Yigit (2011) comprovou que este indutor leva à resistência induzida em plantas de alface contra *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

Em plantas pulverizadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹), também foi observado um aumento da atividade de peroxidases 2 dias após a aplicação da suspensão, porém, esta elevação da atividade enzimática, foi ainda maior posteriormente ao desafio das plantas com o patógeno. Segundo Kunh (2007), mecanismos de defesa das plantas podem ser

aconicionados apresentando maior expressão a partir do desafio com determinado agente patogênico, em um processo denominado de efeito *priming*. Porém, em muitos casos, o elicitor provoca uma super expressão das enzimas na planta tratada e esta não mostra incremento significativo da atividade enzimática após a inoculação de microrganismos fitopatogênicos, como o ocorrido na atividade de peroxidases em plantas de tomateiro tratadas com ASM ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), GOMA ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) ou PX ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e inoculadas posteriormente com *X. gardneri*.

Outros pesquisadores observaram a atividade de peroxidases sempre que as plantas expressavam a resistência induzida. Cavalcanti et al. (2007), por exemplo, observaram que a suspensão aquosa do micélio de *Crinipellis perniciosa*, contendo quitosana, induziu a resistência de plantas de tomate contra *X. vesicatoria* e reduziu a severidade da doença, aumentando a atividade das peroxidases. Caruso et al. (2001) comprovaram que as peroxidases desempenham um papel de defesa contra patógenos invasores de grãos de trigo. Estas enzimas, além de produzirem radicais livres, tóxicos para o patógeno, em explosão oxidativa, podem participar da síntese de lignina, bem como produzir moléculas sinalizadoras como o H_2O_2 , que podem levar à expressão de genes relacionados a outros mecanismos de resistência e assim, levar à redução da severidade de doenças em plantas (MACHEIX; FLEURIET; QUESSADA, 1986; VAN LOON; VAN STREIN, 1999; BINDSCHEDLER et al., 2002; PASSARDI et al, 2005; PIETERSE et al., 2005; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

A reação de hipersensibilidade e o aumento de peroxidases são evidências da ativação dos mecanismos de defesa vegetal. Porém, também existem outras enzimas intimamente relacionadas com a proteção de plantas contra doenças, como por exemplo, as polifenoloxidasas. As polifenoloxidasas são responsáveis pela degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por microrganismos ou insetos. Um dos resultados mais estudados deste fenômeno é a formação de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas, que são relatadas por possuírem ação antimicrobiana (MACHEIX; FLEURIET; QUESSADA, 1986; BINDSCHEDLER et al., 2002; CAMPOS et al., 2004).

A atividade de polifenoloxidasas, neste trabalho, foi aumentada apenas em plantas pulverizadas com PB ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e ASM ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo observado um efeito *priming* em tomateiros tratados com o polissacarídeo. Yasser (2012), ao aplicar ácido salicílico em tomateiros

também observou um aumento da atividade de polifenoloxidasas e uma consequente redução da severidade da mancha bacteriana (*X. vesicaoria*). Liu et al. (2007), ao aplicar quitosana em tomate, verificaram uma redução significativa da severidade das doenças causadas por *B. cinerea* e *P. expansum* e um aumento da atividade de peroxidases e de polifenoloxidasas na planta.

Além da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, foi avaliado o acúmulo de compostos fenólicos totais e flavonóides em folhas de tomateiro tratadas com diferentes polissacarídeos e inoculadas 4 dias após a pulverização dos mesmos, sob uma temperatura média de 24,5 °C. As suspensões polissacarídicas não influenciaram no conteúdo de compostos fenólicos totais em folhas de tomateiro. Porém, foi evidenciado um aumento no teor de flavonóides em plantas tratadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹) e ASM (25µg.ml⁻¹), após a inoculação do patógeno e em todos os tempos avaliados, respectivamente. Tomateiros pulverizados com GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) e PX (1,5 mg.ml⁻¹), até o quarto dia após a aplicação dos tratamentos, apresentaram o conteúdo de flavonóides menor que o teor em folhas tratadas com água destilada.

Os compostos fenólicos são tóxicos aos agentes patogênicos e são rapidamente produzidos na defesa vegetal, acumulando-se logo após a infecção, especialmente em variedades resistentes. Com tudo, estes compostos podem sofrer uma oxidação por polifenoloxidasas e peroxidases e serem transformados em substâncias com maior poder antimicrobiano. Desta forma, o conteúdo total destes fenólicos podem não apresentar uma elevação em plantas elicitadas, caso haja o aumento de enzimas capazes de promover a oxidação dos mesmos (BINDSCHIEDLER et al., 2002; MOTOYAMA et al., 2003; CAMPOS et al., 2004).

Os flavonóides, a maior classe de fenólicos vegetais, têm mostrado a capacidade de controlar doenças em plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana indireta quanto direta, inibindo a atividade de celulasas, pectinases e xilanasas dos patógenos (SKADHAUGE; THOMSEN; WETTSTEIN, 1997). As peroxidases são proteínas envolvidas na polimerização de fenilpropanóides, que iniciam a síntese de compostos desta natureza. Por isso, sugere-se que o aumento da atividade de peroxidases pode estar relacionado com a elevação do teor de flavonóides em plantas de tomate e, consequentemente, com a redução da severidade da mancha bacteriana observada no presente trabalho (BINDSCHIEDLER et al., 2002; MOTOYAMA et al., 2003; CAMPOS et al., 2004; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Com estes resultados, pode-se afirmar que a PB, GOMA e PX podem induzir resistência em plantas de tomate cultivadas em casa de vegetação a 24,5° C e a um fotoperíodo > 12 h, já que todos os polissacarídeos foram capazes de aumentar a atividade de enzimas envolvidas na defesa vegetal, de provocar um acúmulo de peróxido de hidrogênio e de reduzir significativamente a severidade da mancha bacteriana. Além disso, não foi observado e comprovado um efeito antimicrobiano de PB e GOMA sobre a *X. gardneri*.

Além do aumento enzimático ter sido evidenciado em tomateiros cultivados sob altas temperaturas e dias longos, também observou-se um incremento da atividade de enzimas em plantas cultivadas em casa de vegetação sob uma temperatura média de 19,2 °C, sob dias curtos e tratadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) ou PX (1,5 mg.ml⁻¹). Com relação à peroxidases, observou-se que todos os polissacarídeos aumentaram significativamente a atividade desta enzima em plantas não inoculadas, em todos os intervalos de tempo entre tratamento e inoculação (2, 4 e 6 dias), indicando que não houve um efeito *priming*. A participação das peroxidases na resistência induzida de tomateiro contra *Xanthomonas* sp. foi demonstrada por Cavalcanti et al. (2006b), onde após a pulverização das plantas com indutores de resistência comercial (ASM ou Ecolife®), foi evidenciado aumento na atividade destas enzimas logo nas primeiras horas após a pulverização.

Neste caso, a ativação precoce dos mecanismos de defesa da planta pode acarretar em custos energéticos envolvidos com a expressão de genes que podem reduzir a produtividade da cultura. Pois, a alocação de recursos internos para a defesa ou para o crescimento e desenvolvimento do vegetal é determinado pela competição por substrato comum e energia. Além disso, existe o custo metabólico, que é explicado pela repressão de alguns genes envolvidos no crescimento ou no metabolismo primário das plantas. Porém, o custo energético e metabólico é muito menor quando os mecanismos de defesa são pré-condicionados, pois o desvio energético só acontecerá efetivamente na presença do agente patogênico (SOMSSICH; HALHBROCK, 1998; GAYLER et al., 2004).

Por outro lado, o aumento da atividade de polifenoloxidases e da FAL, em relação à testemunha, foi evidenciado apenas após a inoculação das plantas de tomate com o patógeno. As polifenoloxidases, como discutido anteriormente, são proteínas muito importantes na defesa vegetal. Assim como a FAL, que é uma das enzimas-chave na rota dos fenilpropanóides, sendo responsável pela desaminação da L-fenilalanina com consequente formação do ácido *trans*-cinâmico, o qual

é incorporado em diferentes compostos fenólicos envolvidos na formação de flavonóides (RITTER; SCHULZ, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O aumento da atividade da FAL já foi observado por pesquisadores em plantas elicitadas tanto por microrganismos, como por moléculas de origem biótica ou abiótica. Ramamoorthy, Raguchande e Samiyappan (2002), por exemplo, observaram aumento da FAL em plantas de tomate e pepino tratadas com *P. fluorensces* e inoculadas com *P. aphanidermatum*. Latha et al. (2009), ao investigarem o efeito de extrato de alho e bioformulações de rizobactérias promotoras do crescimento na indução de resistência de plantas de tomate contra *Alternaria solani*, observaram um aumento significativo na atividade da FAL.

Nesta pesquisa, observou-se que os tomateiros tratados com PB, GOMA e PX apresentaram atividade da FAL significativamente maior que a das plantas testemunhas. Os intervalos de tempo testados não influenciaram no aumento desta enzima, ou seja, a pulverização aos 2, 4 ou 6 dias antes da inoculação provocou elevações na atividade enzimática que não diferiram estatisticamente entre si. Além disso, a severidade da doença, em plantas cultivadas a 19,2 °C, sob dias curtos e tratadas com os polissacarídeos, também não diferiu em todos os intervalos, indicando que os mecanismos de defesa da planta, nestas condições ambientais, mantiveram-se ativos por períodos mais prolongados e, conseqüentemente, atuaram por mais tempo na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana.

Portanto, PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (1,5 mg.ml⁻¹) e PX (1,5 mg.ml⁻¹) são capazes de ativar mecanismos de defesa do tomateiro em condições variadas de temperatura e fotoperíodo, mas de maneira diferenciada. No primeiro ensaio, a 24,5 °C e dias longos, por exemplo, as polifenoloxidasas não foram ativadas pela pulverização da GOMA e de PX, porém, no segundo, a 19,2 °C e dias curtos, o aumento da atividade desta enzima foi evidenciado. Isso demonstra que o fator temperatura e fotoperíodo podem ter influenciado na intensidade da resposta e nos mecanismos ativados. Para Agrios (1997), as respostas de defesa dependem, além da interação planta-patógeno, dos fatores ambientais, como temperatura, umidade, luz e vento. Por isso, além da temperatura e fotoperíodo, outros fatores ambientais podem estar influenciando tanto nas respostas de defesa, assim como na sua intensidade.

Desta forma, considerando os resultados obtidos, acredita-se que PB e PX podem representar uma forma de controle alternativo da

mancha bacteriana do tomateiro por terem propiciado bons níveis de redução na severidade da doença e por se tratarem de polissacarídeos obtidos de fontes renováveis, não prejudiciais ao meio ambiente. Contudo, a GOMA não foi considerada como uma forma potencial de controle, já que a mesma provocou uma reação de hipersensibilidade macroscópica que pode prejudicar a produtividade da planta.

CAPÍTULO 3 – POTENCIAL DE POLISSACARÍDEOS NO CONTROLE DA PODRIDÃO NEGRA DA COUVE-FLORES

3.1 INTRODUÇÃO

A couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.), variedade botânica descendente da couve-silvestre (*B. oleracea* var. *silvestris*), é uma espécie hortícola pertencente à família Brassicaceae, anteriormente denominada Cruciferae. Esta espécie vegetal possui grande importância para os agricultores familiares que, normalmente, cultivam-na em pequenas áreas ao longo do ano. A produção expressiva de brássicas, como a couve-flor, ocorre principalmente devido ao seu sabor e também ao seu potencial nutricional (SILVA; CASALI, 1981; MAROTO-BORRERO, 1995; FILGUEIRA, 2000).

A couve-flor é uma planta acometida por diversas doenças, dentre elas pode-se destacar a podridão negra, a principal bacteriose das brássicas. Seu agente causal, a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ocorre em muitas regiões do mundo, inclusive no Brasil. Os sintomas provocados por esse agente fitopatogênico manifestam-se em qualquer idade do vegetal. Em plântulas, os cotilédones apresentam-se murchos e com aspecto queimado. Nas plantas adultas, as lesões foliares aparecem necróticas e em formato de “V”, com o vértice voltado para o centro do limbo e com halo amarelado ao redor do tecido necrosado (WILLIAMS, 1980; MATSUOKA et al., 1985; MARINGONI, 2005; CARRIJO; RÊGO, 2000).

Entre os métodos de controle da podridão negra mais utilizados estão os químicos que, muitas vezes, são efetuados de maneira não racionalizada e podem levar ao aumento do percentual de custo de produção, ao favorecimento da seleção de raças resistentes aos produtos aplicados, etc. Por isso, têm-se buscado métodos alternativos de controle de fitomoléstias menos agressivos ao meio ambiente, como por exemplo a indução de resistência vegetal (HAYWARD; WATERSTON, 1965; WILLIAMS, 1980).

A indução de resistência é um aumento do nível de resistência da planta, em consequência da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, utilizando-se de agentes externos. Uma vez que uma planta tenha sido estimulada, ela pode expressar essa capacidade defensiva melhorada independentemente do patógeno desafiador gerar uma interação incompatível ou compatível. Por isso, as alterações na resistência vegetal vêm chamando a atenção da comunidade acadêmica

para a investigação de potenciais indutores de resistência, como é o caso de determinados óleos essenciais, extratos de plantas medicinais, polissacarídeos, moléculas químicas, entre outros (PASCHOLATI; LEITE, 1995; STADNIK; MARASCHIN, 2004).

Polissacarídeos obtidos a partir de microrganismos e plantas são exemplos de moléculas elicitoras capazes de controlar doenças vegetais. A goma xantana, exopolissacarídeo de espécies de bactéria do gênero *Xanthomonas*, além de ser responsável pela aderência de células bacterianas aos substratos e de governar a compatibilidade entre hospedeiro e patógeno, pode ativar mecanismos de defesa de determinadas plantas, como trigo e cevada. O parênquima de reserva da babosa, rico em metabólitos secundários, vitaminas e polissacarídeos, é outro exemplo de agente elicitor atuante na indução de resistência de alguns vegetais, podendo ainda apresentar propriedades antimicrobianas capazes de inibir o desenvolvimento e crescimento de microrganismos (ANTONIAZZI; DESCHAMPS; BACH, 2008; PANDEY; MISHRA, 2010).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da goma xantana e de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* e do parênquima de reserva da babosa na proteção de plantas de couve-flor contra a podridão negra, e verificar o potencial elicitor dos polissacarídeos em questão.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Condições de cultivo e obtenção do isolado

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de março de 2011 a outubro de 2012.

As sementes de couve-flor, da cv. Bola de Neve, suscetíveis a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células com substrato Germina Planta e mantidas em casa de vegetação. Após duas semanas da semeadura, as plântulas, com aproximadamente 4 cm de altura, foram transplantadas para vasos de 21 de capacidade, com terra e composto orgânico em uma proporção de 4:1, v/v.

X. campestris pv. *campestris* foi isolada a partir de folhas coletadas na região de Florianópolis em março de 2010. Para tanto, realizou-se a lavagem do material infectado com água e sabão neutro e,

com auxílio de um escalpelo previamente flambado, efetuou-se cortes (~0,5 cm x 0,5 cm) na região de transição entre o tecido infectado e o sadio.

Os fragmentos foram desinfestados em álcool (50 %) por 30 s e hipoclorito de sódio (2 %) por 60 s. Posteriormente, depositou-se uma gota de água destilada estéril e, com auxílio de um escalpelo, macerou-se o tecido foliar. Este macerado foi plaqueado em meio NA e mantido em estufa a 28 °C.

As bactérias crescidas no meio de cultura foram reisoladas e submetidas aos Postulados de Kock. A colônia bacteriana que provocou sintomas característicos da doença foi preservada a 25° C em tampão fosfato (8,6 mM K₂HPO₄; 7,4 mM KH₂PO₄).

Para a obtenção de inóculo, foi realizada a repicagem desta bactéria, mantida em tampão, com auxílio da alça de platina, para placas de Petri contendo nutriente ágar (NA) [Composição (g/L): peptona de carne 5,0; extrato de carne 3,0; ágar 12,0] (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após 48 h da primeira repicagem, as bactérias crescidas neste meio foram repicadas para novas placas de Petri com meio NA e incubadas por um período de 24 h a 28°C. A suspensão de colônias bacterianas crescidas neste meio foi realizada com água destilada e ajustada para densidade ótica de 0,3 unidades de absorbância a 600 nm.

3.2.2 Extração dos polissacarídeos

Extração dos polissacarídeos da *Xanthomonas gardneri*. A extração dos polissacarídeos provenientes da *X. gardneri* foi efetuada conforme o descrito no capítulo anterior. Para tanto, 100 µl da suspensão bacteriana, cultivada inicialmente em caldo nutriente, foi repicado para placas de Petri contendo meio nutriente ágar. Após o período de incubação, foram adicionados a cada placa de Petri 5 ml de solução salina tamponada. As células bacterianas foram suspensas e a suspensão bacteriana autoclavada e centrifugada. O sedimento obtido na centrifugação foi descartado, ao sobrenadante foi adicionado etanol e, a solução (Sobrenadante + Etanol), foi incubada. O sobrenadante, resultante da incubação em álcool, foi descartado e o sedimento seco em estufa (adaptado de SILVA, 2003).

Extração dos polissacarídeos do parênquima de reserva da babosa. As folhas de babosa, coletadas na fazenda da empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda®, foram previamente lavadas e o seu parênquima de reserva removido, triturado e coado. Posteriormente,

adicionou-se seis volumes de etanol 92 °GL para um volume do gel, sendo a mistura final mantida a 4°C durante 24 h para a floculação dos polissacarídeos. A porção polissacarídica foi filtrada e, em seguida, seca em estufa. O material obtido foi macerado em nitrogênio líquido (CAMPESTRINI, 2007).

Quando de sua utilização, os polissacarídeos da babosa foram solubilizados em HCl 0,05 N mantendo-se a suspensão durante 15 min em agitação em ultra turrax, seguida de aquecimento em banho-maria. As suspensões de polissacarídeos foram resfriadas, incubadas e o pH ajustado para 5,6.

3.2.3 Obtenção da goma xantana e do ASM

A goma xantana aplicada nos experimentos foi a goma comercial da Sigma (Sigma-Aldrich, USA). Para a sua utilização, misturou-se a mesma em água destilada, mantendo-se a suspensão por 30 segundos em agitação em ultra turrax a 3600 rotações por minuto.

Já o acibenzolar-S-metil (ASM; $C_8H_6N_2OS_2$), éster-S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbótico, é o ingrediente ativo do produto comercial Bion® (Singenta). Este produto é o único indutor de resistência comercial registrado no Ministério da Agricultura do Brasil, possui formulação WG - Granulado Dispersível, com classificação toxicológica III. (MAPA, 2011).

3.2.4 Aplicação dos tratamentos, inoculação e avaliação da severidade da doença

Para a avaliação do efeito de concentrações da goma xantana e dos polissacarídeos da babosa sobre a severidade da podridão negra da couve, foram realizados 10 tratamentos: água destilada como controle negativo; polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB) nas concentrações (0,75 mg.ml⁻¹; 1,5 mg.ml⁻¹; 3,0 mg.ml⁻¹; 6,0 mg.ml⁻¹); goma xantana (GOMA) comercial nas concentrações (0,25 mg.ml⁻¹; 0,5 mg.ml⁻¹; 0,75 mg.ml⁻¹; 1,5 mg.ml⁻¹); e o acibenzolar-S-metil (ASM) a 25 µg.ml⁻¹, como controle positivo. Em um experimento posterior, testou-se o efeito dos polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) sobre a podridão negra nas concentrações (0,5 mg.ml⁻¹; 1,0 mg.ml⁻¹; 1,5 mg.ml⁻¹; 2,0 mg.ml⁻¹; 2,5 mg.ml⁻¹; 3,0 mg.ml⁻¹), como controle negativo utilizou-se a água destilada e como controle positivo o ASM (25 µg.ml⁻¹).

Após estabelecida a melhor concentração de cada polissacarídeo para o controle da podridão negra, efetuou-se um ensaio para avaliar quais dos polissacarídeos possuíam maior eficiência no controle da doença. Para tanto, aplicaram-se sobre as plantas os seguintes tratamentos: água destilada, como controle, PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), GOMA ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) ou PX ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Os tratamentos foram aplicados (10 ml por planta), com auxílio de uma pistola de pintura acoplada a um compressor de ar, em plantas com pelo menos cinco folhas definitivas, cultivadas em casa de vegetação a uma temperatura média de $19,3^\circ\text{C}$. Após 4 dias da aplicação dos tratamentos, foi realizada a inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (0,3 unidades de absorbância a 600 nm), pulverizando-se a suspensão bacteriana principalmente nos bordos foliares, onde estão concentrados os hidatódios, com a manutenção das plantas em câmara úmida por um período de 48 h. A avaliação da severidade da doença (% da área foliar lesionada) foi efetuada duas semanas após a inoculação, através do *software* Quant (VALE et al., 2003).

Os experimentos foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo que a parcela experimental foi representada por um vaso com uma planta. Os resultados foram submetidos à análise de regressão, utilizando o *software* estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.2.5 Efeito antimicrobiano

A goma xantana ou os polissacarídeos da *Xanthomonas gardneri* ou da babosa foram previamente preparados e incorporados em meio de cultura NA. A preparação deu-se de modo que a concentração final do polissacarídeo fosse equivalente a 0,5; 0,75; 1,5 ou $3,0 \text{ mg.ml}^{-1}$. Os tratamentos foram vertidos em placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro.

Após a solidificação do meio, alíquotas de $100 \mu\text{L}$ da bactéria (*X. campestris*), com 0,3 unidades de absorbância a 600 nm, foram pipetadas sobre a superfície e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Como controle, foi utilizada água destilada incorporada em NA. As placas foram incubadas a 28°C por 48 h e a avaliação realizada através da obtenção de uma suspensão bacteriana em 5 ml de água destilada e leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm (COQUEIRO, 2010).

O experimento foi montado sobre delineamento experimental inteiramente casualizado, com 13 tratamentos e cinco repetições, sendo

cada parcela experimental representada por uma placa. Os resultados foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se o *software* estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.2.6 Reação de hipersensibilidade e atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

Reação de hipersensibilidade. Neste ensaio avaliou-se a reação de hipersensibilidade em plantas de couve, com cinco folhas definitivas, tratadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹), GX (0,5 mg.ml⁻¹), PX (0,5 mg.ml⁻¹), água destilada (controle negativo) ou ASM (25 µl.ml⁻¹) e inoculadas com suspensão bacteriana de *X. campestris* pv. *campestris* (DO 0,3; 600nm). As plantas foram tratadas e inoculadas conforme o descrito no item 3.2.2.

Após 24 horas da aplicação dos polissacarídeos, foram coletados cinco discos foliares ($\varnothing = 8,0$ mm) de cada tratamento para cada repetição. Passados 24 horas da inoculação, foi realizada uma nova amostragem. A avaliação da reação de hipersensibilidade (RH) foi realizada conforme metodologia descrita por Thordal-Christensen et al. (1997). O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e 10 tratamentos.

Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas. Em plantas de couve, com cinco folhas definitivas, aplicou-se PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (0,5 mg.ml⁻¹), PX (0,5 mg.ml⁻¹), água destilada (controle negativo) ou ASM (25 µl.ml⁻¹) (controle positivo). Após 4 dias da aplicação, foi efetuada a inoculação das plantas com suspensão bacteriana de *X. campestris* pv. *campestris* (DO 0,3; 600nm). Amostras foliares foram coletadas 0, 2, 4 e 6 dias após a aplicação dos polissacarídeos nas plantas. Nestas amostras, avaliou-se a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas. Foram coletados seis discos foliares (160 mg), da segunda folha definitiva, para cada repetição, sendo realizadas cinco repetições por tratamento. As amostras coletadas foram armazenadas em papel alumínio e congeladas imediatamente a -80°C.

O tecido foliar mantido sob baixa temperatura foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Ao macerado, foi adicionado 1,5 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, polivinilpirrolidona 1 % (PVP) e fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 1mM. A suspensão obtida foi centrifugada a 20.000 g por 30 min a 4° C e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado. A atividade das peroxidases foi

determinada usando-se a metodologia de Hammerschmidt, Nuckles, Kuc (1982), com adaptações. Já a atividade das polifenoloxidasas foi determinada utilizando-se o método de Duangmal e Apentem (1999). A dosagem de proteínas totais foi efetuada conforme o método de Bradford (1976).

Para tanto, a reação das peroxidases foi conduzida adicionando-se 50 µl do extrato protéico em 2,95 ml de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM. A atividade da enzima foi avaliada através do espectrofotômetro, onde foi medida a conversão do guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi conduzida por 4 min a 40 °C, com os valores de DO sendo anotados a cada 30 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por mg de proteína por minuto ($\text{DO}_{470 \text{ nm}} \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Já a reação das polifenoloxidasas foi conduzida adicionando-se 200 µl do extrato proteico, em 2,8 ml de tampão fosfato 60 mM (pH 6,0) contendo catecol 60 mM. A atividade de polifenoloxidasas foi avaliada através do espectrofotômetro, onde mensurou-se a oxidação do catecol convertido em quinona. A reação foi conduzida por 1 min a 40 °C, com os valores de DO sendo anotados a cada 3 s. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 420 nm por mg de proteína por minuto ($\text{DO}_{420 \text{ nm}} \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para análise do comportamento da atividade enzimática com o passar do tempo, após a aplicação dos tratamentos, foi realizada uma análise de regressão, análise de variância (*one-way* ANOVA) e o teste *tukey* dentro de cada tempo, através dos *softwares* estatísticos Sisvar (FERREIRA, 2003) e Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

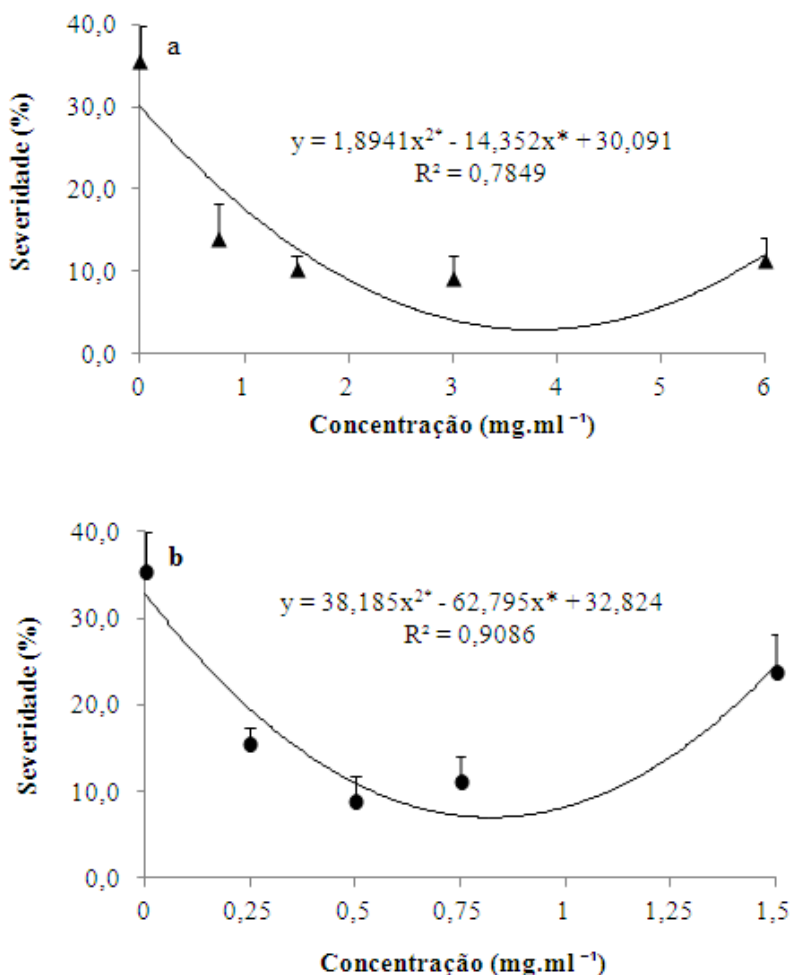
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeito de polissacarídeos sobre a severidade da podridão negra em couve-flor

Os polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB) reduziram significativamente a podridão negra em plantas de couve-flor, sem apresentar um efeito dose-dependente. Todas as doses testadas foram eficientes no controle da doença, reduzindo em média 69,0 % da severidade em relação à testemunha (FIGURA 13a). Já a

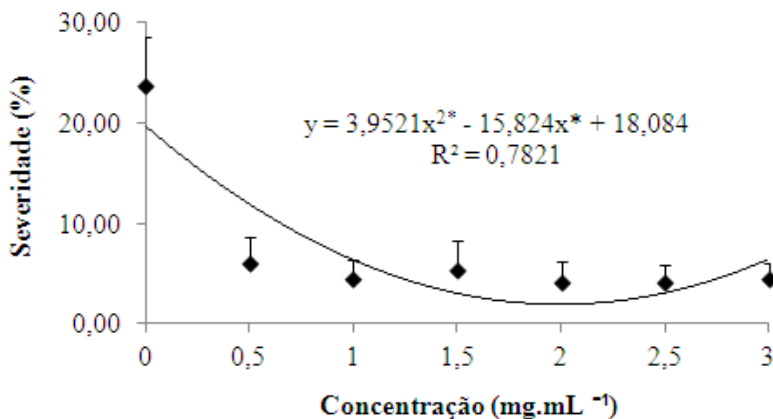
goma xantana foi capaz de reduzir a podridão apenas em doses mais baixas, diminuindo aproximadamente 66,4 % da severidade em comparação às plantas tratadas com água destilada. A maior concentração do polissacarídeo não foi eficiente no controle da doença, não diferindo estatisticamente da severidade na testemunha (FIGURA 13b). O ASM, indutor de resistência comercial, reduziu 91,4 % da podridão negra.

FIGURA 13. Severidade da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲ - 0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 mg.ml⁻¹) e de goma xantana - GOMA (● - 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,5 mg.ml⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,3 unidades de absorvância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 14 dias após a inoculação. Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p < 0,05). *significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) = 3,0 %



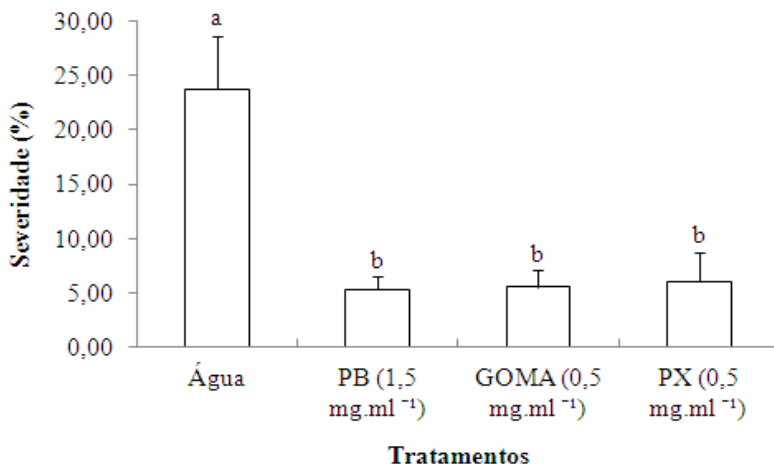
Os polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) reduziram significativamente a severidade da podridão negra da couve-flor em relação à testemunha. As plantas tratadas com PX, em diferentes concentrações, não apresentaram valores de severidade estatisticamente diferentes entre si. Em média, as doses aplicadas, foram capazes de reduzir a severidade da doença em 77,8 % em relação às plantas tratadas com água destilada (FIGURA 14).

FIGURA 14. Severidade da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de polissacarídeos extraídos de *Xanthomonas gardneri* – PX (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.mL⁻¹). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 14 dias após a inoculação. Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F (p <0,05). *Significativo a 5 % de probabilidade. Severidade média em plantas tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) = 3,9 %



Em experimento posterior, buscou-se comparar a eficiência de PB (1,5 mg.mL⁻¹), GOMA (0,5 mg.mL⁻¹) e PX (0,5 mg.mL⁻¹) no controle da podridão negra em couve-flor. Neste ensaio observou-se que não houve diferença estatística entre os polissacarídeos aplicados. Todos foram eficientes no controle da doença, reduzindo em média 76,31 % com relação à testemunha (FIGURA 15). Não foi observada necrose ou fitotoxidez nas folhas tratadas.

FIGURA 15. Severidade da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em plantas de couve-flor tratadas com polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), com goma xantana - GOMA ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) e com polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* - PX ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$). Os tratamentos foram aplicados nas plantas 4 dias antes da inoculação com a bactéria (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm) e a avaliação da severidade da doença feita 14 dias após a inoculação. Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.



3.3.2 Atividade antimicrobiana de polissacarídeos sobre a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

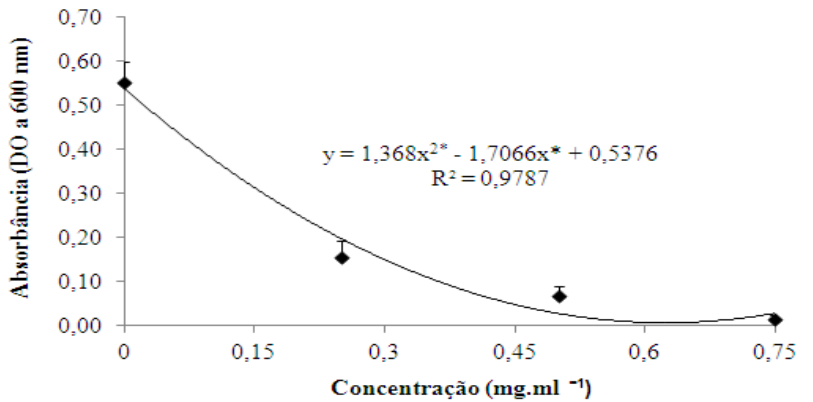
A ANOVA fatorial acusou interação entre tratamentos (PB, GOMA e PX) e concentrações (0; 0,25; 0,5; $0,75 \text{ mg.ml}^{-1}$) (TABELA 8). PB e GOMA não apresentaram um efeito direto sobre a *X. campestris*. Já PX, reduziu significativamente a proliferação *in vitro* das colônias bacterianas, chegando a diminuir 97,6 % o crescimento do microrganismo em relação à testemunha (FIGURA 16).

TABELA 8. Efeito de concentrações (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg.ml⁻¹) de polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), goma xantana (GOMA) e polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* (PX) sobre o crescimento *in vitro* da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Tratamento/ Doses (mg.ml ⁻¹)	Absorbância (DO) a 600 nm da suspensão bacteriana após 48 horas de incubação			
	0,00	0,25	0,50	0,75
PB	0,55 ± 0,05 Aa *	0,63 ± 0,06 Aa	0,64 ± 0,16 Aa	0,63 ± 0,10 Aa
GOMA	0,55 ± 0,05 Aa	0,59 ± 0,11 Aa	0,59 ± 0,10 Aa	0,60 ± 0,09 Aa
PX	0,55 ± 0,05 Aa	0,15 ± 0,04 Bb	0,07 ± 0,02 Cb	0,01 ± 0,01 Db

*Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. Os dados foram transformados em raiz quadrada.

FIGURA 16. Efeito de concentrações de polissacarídeos extraídos da *Xanthomonas gardneri* – PX (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg.ml⁻¹) sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Foi observado efeito de dose dependente de acordo com o teste F (p <0,05). * Significativo a 5 % de probabilidade.



3.3.3 Reação de hipersensibilidade e atividade de peroxidases e polifenoloxidasas

Não se observou a presença de células hipersensitivas ou com acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas de couve-flor tratadas com PB (1,5 mg.ml⁻¹), GOMA (0,5 mg.ml⁻¹) ou PX (0,5 mg.ml⁻¹). Todos os polissacarídeos testados não foram capazes de provocar reação de hipersensibilidade nesta espécie vegetal mesmo após a inoculação da planta com o agente patogênico da podridão negra.

Porém, verificou-se um aumento da atividade de peroxidases em plantas pulverizadas com GOMA e PX 2 e 4 dias após a aplicação dos tratamentos sobre as plantas, respectivamente. Após a inoculação dos vegetais com o agente patogênico da podridão negra, tanto as plantas tratadas com suspensões polissacarídicas ou com ASM (25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) apresentaram atividade de peroxidases semelhante à atividade enzimática de folhas de couve-flor pulverizadas com água destilada (FIGURA 17). Não foi observada uma interferência significativa dos polissacarídeos testados sobre a atividade de polifenoloxidasas em couve-flor (FIGURA 18).

FIGURA 17. Atividade de peroxidases em folhas de couve-flor tratadas com água destilada (■; $y = -0,138x^2 + 0,88x + 2,68$; $R^2 = 0,94$), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa - PB (▲; $y = -0,14x^2 + 1,053x + 2,55$; $R^2 = 0,96$), goma xantana - GOMA (●; $y = -1,07x^2 + 6,69x + 2,19$; $R^2 = 0,95$); polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* - PX (×; $y = -0,57x^2 + 3,56x + 2,2$; $R^2 = 0,86$) ou acibenzolar-S-metil - ASM (◆; $y = 0,375x^2 + 2,31x + 2,01$; $R^2 = 0,55$). O símbolo “Xc” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DO 0,3 unidades de absorvância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. *Significativo a 5 % de probabilidade de acordo com o teste F ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de tukey.

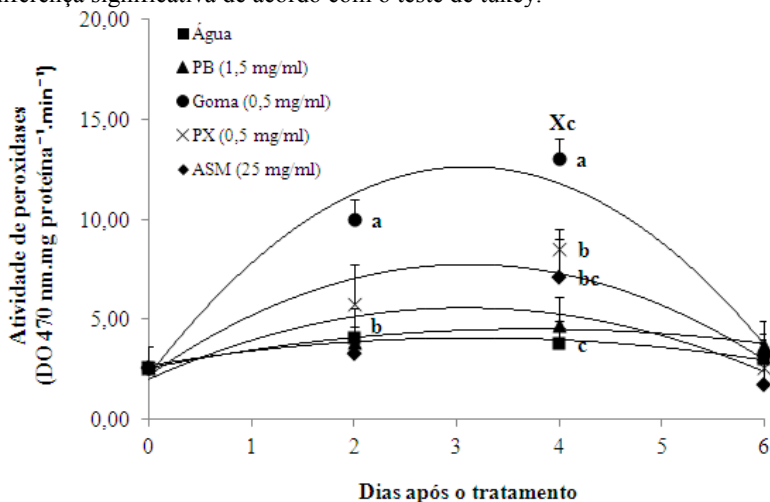
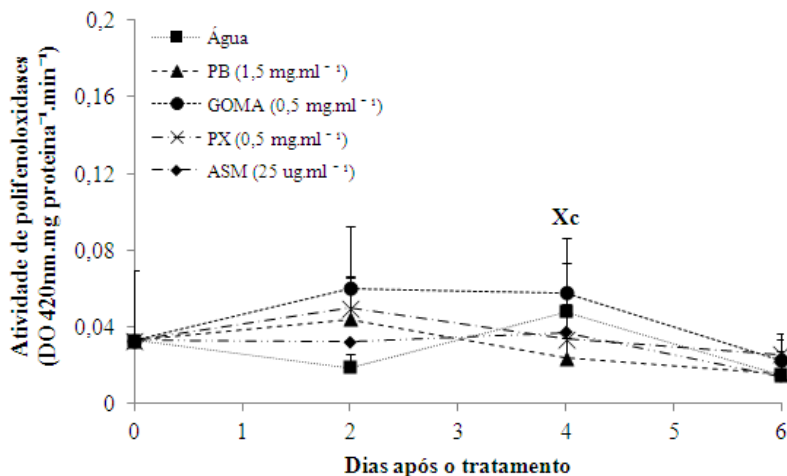


FIGURA 18. Atividade de polifenoloxidasas em folhas de couve-flor tratadas com água destilada (■), polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa – PB (▲), goma xantana – GOMA (●; polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* – PX (×; $y = 0,03x + 0,07$; $R^2 = 0,95$) ou acibenzolar-S-metil – ASM (◆). O símbolo “Xc” indica o momento da inoculação com a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (DO 0,3 unidades de absorbância a 600 nm). Barras de erros indicam o desvio padrão. O teste F ($p < 0,05$) não foi significativo a 5 % de probabilidade.



3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que o ASM, indutor de resistência comercial, não registrado para a cultura da couve-flor, promoveu uma redução significativa da severidade da podridão negra. A proteção de vegetais contra doenças fitopatogênicas, através da aplicação deste produto, já foi observada por outros autores. Friedrich et al (1996), por exemplo, verificaram que o ASM conferiu proteção em fumo contra o vírus TMV e os fungos *Cercospora nicotianae*, *Phytophthora tabacina*, *Phytophthora parasitica* e as bactérias *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. Lawton et al. (1996) observaram que o ASM protegeu *Arabidopsis thaliana*, planta da mesma família da couve-flor, contra o fungo *P. parasitica*, a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e ao vírus TCV. Por isso, julga-se o ASM como um eficiente controlador de doenças vegetais, pois é capaz de reduzir a severidade de inúmeras moléstias e, além disso, de ativar mecanismos de defesa latentes de determinadas plantas.

Além do ASM, também verificou-se que todas as concentrações de PB e PX aplicadas sobre plantas de couve-flor controlaram a podridão negra, não sendo diagnosticada uma diferença estatística entre as doses dos polissacarídeos testados. De acordo com Nurnberger et al. (2004), os oligo e polissacarídeos derivados de fungos ou plantas são classes bem caracterizadas de elicitores que, em determinados casos, podem induzir resistência mesmo em baixas concentrações. Porém, na grande maioria das vezes não há uma relação dose-dependente entre a concentração aplicada do elicitor e o nível de elicitação alcançado. Desta forma, como houve uma redução significativa da severidade da podridão negra, independente da dose aplicada de PB ou PX, acredita-se que, possivelmente, esses polissacarídeos estejam elicitando mecanismos de defesa do vegetal, mas, para a confirmação desta hipótese são necessárias maiores investigações.

Moléculas, principalmente de origem microbiana, têm sido investigadas e o desenvolvimento de produtos comerciais tem sido alcançado. O ProAct, indutor de resistência comercial, por exemplo, é uma combinação de quatro fragmentos de proteína harpina, derivados de três bactérias de ocorrência natural: harpinN e harpinW de *E. amylovora*, popA de *Ralstonia solanacearum* e harpinZ de *Pseudomonas syringae*, utilizado para o controle de doenças vegetais (DAYAN, 2006). Danner et al. (2008), em trabalho realizado com pêssegos tratados com este produto, verificaram uma redução de 31,5 % dos sintomas provocados por *Monilinia fructicola* com aumento da atividade da FAL e um acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos vegetais. Desta forma, pode-se afirmar, que moléculas extraídas de microrganismos, até mesmo fitopatogênicos, podem atuar com eficiência no controle de fitomoléstias ativando mecanismos de defesa vegetal, ou ainda tendo uma ação antimicrobiana, reduzindo ou eliminando microrganismos maléficos às plantas.

Neste trabalho, observou-se que a goma xantana, polissacarídeo de origem microbiana, foi eficiente na redução da podridão negra somente em concentrações menores. Sendo que a maior dose, 1,5 mg. ml⁻¹, não foi capaz de controlar os sintomas provocados pela doença nesta planta. Tratando-se de um exopolissacarídeo capsular, característico da *X. campestris* pv. *campestris*, a goma xantana protege a célula bacteriana contra intempéries do ambiente (ONSANDO, 1992). Além disso, Hsu e Goodman (1978), ao trabalharem com a queima da macieira e da pera (*Erwinia amylovora*), constataram que o exopolissacarídeo capsular, quando isolado e purificado da própria bactéria, possuía a função de toxina com especificidade de hospedeiro.

Segundo os autores, o polissacarídeo quando aplicado sobre a planta produzia sintomas no local onde o mesmo foi pulverizado.

Muitos estudos têm comprovado que moléculas da superfície da cápsula bacteriana, como os expolissacarídeos, governam a compatibilidade, ou seja, o reconhecimento do microrganismo pelo seu hospedeiro e vice e versa (GOODMAN, 1986; ROMEIRO, 2005; ABRAMOVITCH; ANDERSON; MARTIN, 2006). Sendo assim, no caso das plantas de couve-flor, sugere-se que a GOMA, em doses elevadas, pode agir como toxina e levar a lesões necróticas no limbo foliar da planta, facilmente confundidas com os sintomas provocados pelo agente patogênico da podridão negra. Porém, em baixas concentrações, poderia elicitar alguns mecanismos de defesa do vegetal. A indução de resistência de plantas ocasionada por moléculas ou por patógenos contra o próprio microrganismo já foi bem documentada. Segundo Hammerschmidt, Nuckles e Kuc (1982) a inoculação da primeira folha verdadeira de pepino com *Colletotrichum lagenarium* levou a uma maior atividade da peroxidase na segunda folha e induziu resistência sistêmica contra o mesmo fungo.

Com relação ao efeito de PB, GOMA e PX sobre o crescimento *in vitro* do agente patogênico da podridão negra, observou-se que apenas os polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* foram capazes de produzir um efeito negativo sobre a fitobactéria em estudo, sendo que a maior concentração (0,75 mg. ml⁻¹) reduziu quase 100 % do crescimento de *X. campestris*. Neste caso, o processo de extração dos polissacarídeos pode ter levado a liberação de moléculas tóxicas à outra espécie de *Xanthomonas*. Os resultados obtidos nesse experimento foram diferentes dos verificados no capítulo anterior, onde PX reduziu o crescimento da *X. gardneri* em todas as concentrações testadas, não havendo uma relação dose-dependente. Quando a resistência de uma bactéria é moderada a determinada molécula, um simples aumento da dose da mesma pode eliminar completamente o crescimento do microrganismo, contudo, quando existe uma resistência intensa, este incremento torna-se inócuo ao seu desenvolvimento (TRABULSI; ALTERTHUM; CANDEIAS, 1999). Por isso, acredita-se que PX exerceu uma efetiva atividade antimicrobiana apenas sobre a *X. campestris*, pois o aumento da concentração polissacarídica culminou na eliminação de quase 100 % dessa espécie bacteriana *in vitro*. Este fator, por sua vez, pode ter contribuído para a redução da severidade da podridão negra, observada nos experimentos *in vivo*.

Além da verificação da influência de polissacarídeos sobre o crescimento *in vitro* da *X. campestris* pv. *campestris*, também efetuou-se

um experimento relacionado ao efeito de PB ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), GOMA ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), PX ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) e ASM ($25 \mu\text{g.ml}^{-1}$) sobre a atividade de enzimas responsáveis pela defesa em plantas de couve-flor. Neste ensaio, não foi observada uma alteração da atividade de polifenoloxidasas. Contudo, verificou-se que após 2 e 4 dias da aplicação dos tratamentos a GOMA e os PX elevaram significativamente a atividade de peroxidases, respectivamente. Porém, após a inoculação do agente patogênico da podridão negra, os níveis de peroxidase em plantas tratadas com polissacarídeos ou com ASM não foram diferentes dos níveis observados em plantas pulverizadas com água destilada.

Como documentado por Gaspar, Penel e Thorpe (1982); Siegel (1993); Donald e Cipollini (1998), em qualquer condição de estresse, como mudanças nas condições climáticas, injúrias mecânicas, etc., os vegetais apresentam alta atividade de peroxidases e frequentemente, estas são as primeiras enzimas a terem sua atividade alterada após o estímulo. Contudo, a ativação de outros mecanismos de defesa podem levar a supressão da atividade desta proteína.

Com isso, sugere-se que, logo após a aplicação de GOMA e PX, pode ter ocorrido um estresse e uma rápida elevação da atividade de peroxidases, porém, a possível ativação de outros mecanismos, após a inoculação das plantas de couve-flor, pode ter levado a redução da atividade de peroxidases. Para a confirmação desta hipótese é necessário a realização de experimentos que visem à detecção da ativação de outros mecanismos de defesa das plantas, que podem estar influenciando tanto na redução da podridão negra, como na atividade de peroxidases.

Sendo assim, devido à redução significativa da severidade da podridão negra, proporcionada pelos polissacarídeos em estudo, acredita-se que a aplicação de PB, GOMA e PX podem apresentar uma alternativa de controle aos métodos convencionais aos atualmente adotados. Porém, o mecanismo de ação desses polissacarídeos necessita de maiores investigações.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados desse estudo é possível concluir que:

- (i) os polissacarídeos extraídos do parênquima de reserva da babosa (PB), a goma xantana (GOMA) e os polissacarídeos extraídos da *X. gardneri* (PX) apresentam capacidade de reduzir a severidade da mancha bacteriana do tomateiro e da podridão negra em couve-flor, o que pode estar associado a uma indução de respostas de defesa;
- (ii) não há uma atividade antibacteriana de PB e GOMA sobre a *X. gardneri* e *X. campestris* pv. *campestris*;
- (iii) PX possui uma ação antimicrobiana sobre *X. gardneri* e *X. campestris* pv. *campestris*;
- (iv) o aumento nas atividades de peroxidases, polifenoloxidasas e da FAL pelo tratamento com PB, GOMA e PX podem contribuir para a redução da mancha bacteriana do tomateiro;
- (v) o conteúdo de flavonóides é influenciado pela aplicação de PB, GOMA e PX em plantas de tomate, e isto pode estar influenciando na redução da severidade da mancha bacteriana;
- (vi) é necessário a avaliação de novos mecanismos de defesa da couve-flor para a confirmação da ativação dos mesmos quando submetidos aos polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVITCH, R. B.; ANDERSON, J. C.; MARTIN, G. B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7(8), p.601-11, 2006.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic Press, 1997. 635 p.

ALVARENGA, M. A. R.. **Tomate**: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: Editora UFLA, 2004, 393 p.

ANTONIAZZI, N.; DESCHAMPS, C.; BACH, E. E. Effect of xanthan gum and allicin as elicitors against *Bipolaris sorokiniana* on barley in field Experiments. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.115, p.104–107, 2008.

BACH, E. E. **Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris* spp. e *Drechslera tritici repentis* do trigo**: aspectos bioquímicos nas interações e indução de resistência. 1997. 150 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1997.

BACH, E. E.; BARROS, B. C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivate conidia suspension. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.411-418, 2003.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LOPEZ, M.; AIT BARKA, E.; BOSQUEZ-MOLINA E.; WILSON, C.L. Chitosan as potential natural compounds to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v.25, p.108-118, 2006.

BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.21–81, 1981.

BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, v.22, p.285–290, 2003.

BINDSCHEDLER, L.F. et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. Oxford, UK. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1357-1376, 2002.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.189-214, 1995.

BOLWELL, G. P.; COULSON, V.; RODGERS, M. W.; MURPHY, D. L.; JONES, D. Modulation of the elicitation response in cultured french bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. **Phytochemistry**, v.30, n.2, p.397-405, 1991.

BONALDO, S. M. SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.128-134, 2004.

BONGIOVANI, R. A. M. **Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB- 05 em três fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose**. 2008. 112 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, SP, 2008.

BOUZAR, H., J. B. JONES, R. E. STALL, F. J. LOUWS, M. SCHNEIDER, J. L. W. RADEMAKER, F. J. DE BRUIJN, AND L. E. JACKSON. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v.89, p.328-335, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAMARGO, L. S. **As hortaliças e seu cultivo**. 3ed. Campinas: Fundação Cargill, 1992. 253 p.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio ambiente, 2003, 279 p.

CAMPESTRINI, L. H. *Aloe barbadensis* Miller: Análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (fp) e da Acemanana. 2007. 205 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil, 2007.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão a antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.637-643, 2004.

CARPANO, S. M.; CASTRO, M. T.; SPEGAZZINI, E. D. Comparative morphoanatomical characterization between *Aloe vera* (L.) Burm. F., *Aloe arborescens* Mill., *Aloe saponaria* Haw. and *Aloe ciliaris* Haw. (Aloaceae). **Revista brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1b, p.269-275, 2009.

CARRIJO, I. V.; RÊGO, A. M. Doenças das brássicas. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. v.1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 444 p.

CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARD, L.; BERTIN, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, v.58, p.743-750, 2001.

CASIAN, R. O.; PARVU, M.; VLASE, L.; TAMAS, M. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. **Fitoterapia**, v.78, p.219–222, 2007.

CASTRO, O.; BACH, E. E. Increased production of b-1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystems treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.165-169, 2004.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of

Crinipellis perniciosus mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v.26, p.729–738, 2007.

CAVALCANTI, F. R., RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006a.

CAVALCANTI, F. R., RESENDE, M. L. V., ZACARONI, A. B., RIBEIRO JUNIOR, P. M., COSTA, J. C. B. e SOUZA, R. M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.372-380, 2006b.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263p.

CEPA. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2008/2009**. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>> Acesso em: 25 abr 2010.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v.84, n.3, p.236-242, 1994.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly Review of Biology**, v.8, p.275-324, 1933.

CHOI, S.; CHUNG, M. H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Seminars and Integrative Medicine**, v.1, p.53-62, 2003.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITTE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, Z.; et al. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant Cell and Environment**, Great Britain, v.27, n.7, p.917–928, 2004.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v.7, n.5, p.210-216, 2002.

COQUEIRO, D. S. O. **Atividade de quitosanas e da fração polissacarídica da babosa para o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em plantas de tomate**. 2010. 112p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil, 2010.

CURSINO-SANTOS, J. R; DEFINA, T. P. A; MARTINEZ-ROSSI, N. M. **Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular**. São Paulo: RiMa, 2003.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z; MEDEIROS, J. G. S.; MARCHESE, J. A.; MAZARO, J. M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de elicitores em pós-colheita. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, p.793-799, 2008.

DAYAN, F. E. Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. **Planta**, v.224, p.339-346, 2006.

DEFFUNE, G. Semioquímicos, fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal na agricultura orgânica: a explicação dos defensivos agrícolas. In: **Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica**. Resumos. Botucatu-SP:Agroecológica, p.33-43, 2001.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, S.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v.21, p.703-714, 2004.

DINIZ, L. P; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUT, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.171-179, 2006.

- DIXON, R. A. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. **Biological Reviews**, v.61, p.239–91, 1986.
- DONALD, F.; CIPOLLINI, J. The induction of soluble peroxidases activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.85, n.11, p.1586-1591, 1998.
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p.351- 359, 1999.
- DYE, D. W. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas species*. **New Zealand Journal of Science**, v.9, p.913-919, 1966.
- EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.235-264, 1986.
- FALCÓN, A. et al. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.103–112, 2008.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>> Acesso em: abr 2011.
- FEMENIA, A.; SÁNCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v.39, p.109-117, 1999.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR v. 4.3 (Build 45)**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2003.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FONTES, P. C. R.; SILVA, D. J. H. **Produção de tomate de mesa**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002, 196p.

FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.1, p.29-38, 2007.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; GUTRELLA, M.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.-P.; KESSMAN, H.; RYALS, J., A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, v.10, n.1, p.61-70, 1996.

GALLI, Ferdinando. **Manual de fitopatologia**. 2ed. São Paulo (SP): Agronômica Ceres, 1978-1980.

GASPAR, T. H.; PENEL, C. L.; THORPE, T. **Peroxidases**: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, 1982. 313p.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, v.18, p.363-371. 2004.

GIOVANELLI, G.; PARADISO, A. Stability of dried and intermediate moisture tomato pulp during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7277-7281, 2002.

GONZÁLEZ, J.; REYES, F.; SALAS, C.; SANTIAGO, M.; CODRIANSKY, Y.; COLIHEUQUE, N.; SILVA, H. *Arabidopsis thaliana*: A model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of *Botrytis cinerea*. **Biological Research**, v.39, p.221-228, 2006.

GOODMAN, R. N. **The Biochemistry and Physiology of Plant Disease**. Missouri: University of Missouri, 1986. 433p.

GUZZO, S. D; BACK, E. A; MARTINS, E. M; MORAES, W. B. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*,

Xanthomonas campestris pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, v.139, p.119-128, 1993.

HABEEB, F.; SHAKIR, E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M. R.; DRUMMOND, A. J.; GRAY, A. I. FERRO, V. A. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. **Methods**, v.42, p.315-320, 2007.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, n. 3, p. 387-412, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. Vol. 1. London: Academic Press, 1989. 415p.

HAYWARD, A. C.; WATERSTON, J. M. *Xanthomonas campestris*. **CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. Kew, Commonwealth Mycological Institute, n.47. 2p, 1965.

HILDEBRAND, D. C.; PALLERONI, N. J.; SCHROTH, M. N. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p.263-269, 1990.

HSU, S. T.; GOODMAN, R. N. Agglutinating activity in apple cell suspension cultures inoculated with a virulent strain of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, v.68(3), p.355-360, 1978.

IBGE. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jul 2011.

IBGE. **Banco de dados agregados**. Disponível em:
 <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 23 nov 2012.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.171-180, 2003.

JAITI, F.; VERDEIL, J. L. V.; EL HADRAMI; I. Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp.*albedinis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.74, p.84-90, 2009.

JANISIEWICZ, W. J. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonist used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. **Phytopathology**, v.86, p.473-479, 1996.

JARUATA, M. J. O; FANTOVA, M. C. **Catálogo de semillas de tomates autóctonos: Banco de Germoplasma de Plantas Hortícolas de Zaragoza**. Diputación General de Aragón. Aragón. ES, 1999. 71p.

JASSO DE RODRÍGUEZ, D. et al. Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.81-87, 2005.

JENKINS, J. A. The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany**. v.2, p.379-392, 1948.

JONES, J. B.; LANCY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.755-762, 2004.

JONES, J. B.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; ALMIRA, E. C.; ROBERTS, P. D.; BOWEN, B. W.; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P. M.; CHUN, J. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1211-1219, 2000.

JONES, J. B.; STALL, R. E.; BOUZAR, H. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.41-58, 1998.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of Tomato Diseases**. St Paul: APS Press, 1991. 73p.

KALOSHIAN, I. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, n.12, p.2419-2438, 2004.

KEEN, N. T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens?. **Science**, v.187, p.74-75, 1975.

KLARZYNSKY, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J. M.; YVIN, J. C.; KOPP, M.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Linear β -1,3, glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 1027-1037, 2000.

KRONKA, A. Z. **Cancro bacteriano no tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle**. 2004. 79p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção**. 2007. 140p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2007.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum langenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and

induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v. 50, p. 85–93, 2009.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**, p. 23-67, 2006.

LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, v.10, p.71-82, 1996.

LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HUAN, S. S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v.1, p.1275-1284, 2001.

LEITE, B.; RONCATO, L. D.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ, C. W.; FERNANDES, J. M. S.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 1997. v.5, p.235-280.

LI, W. ; BI, Y. ; GE, Y. ; LI, Y. ; WANG, J.; WANG, Y. Effects of postharvest sodium silicate treatment on pink rot disease and oxidative stress-antioxidative system in muskmelon fruit. **European Food Research and Technology**, v.234(1), p.137-145, 2012.

LI, B. et al. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas pathogenic* bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymers**, v.72, p.287–292, 2008.

LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Crit. Reviews plant sciences**, v.10, p.123-150, 1991.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, p.300–306, 2007.

LLORENS, J. M. N.; TORMO, A.; MARTÍNES-GARCÍA, E. Stationary phase in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v.34, n.4, p.476-95, 2010.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças bacterianas. In: **Doenças do tomateiro**. 2 ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005.

LOPES, M. C.; STRIPARI, P. C. Produção de hortaliças em ambientes protegido: condições subtropicais. GOTO, R.; TIVELLI, S.W. **Revisão anual de patologia de plantas**. São Paulo: Fundações Editoras da UNESP, 1998. 258p.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; QUESSADA, M. P. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p.267-286.

MALAVOLTA JUNIOR, V. A. Doenças bacterianas em tomateiro: etiologia e controle. In: **Seminário de atualização: Cadeia produtiva do tomate**. Mogi Mirim, 2004.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2011. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 11 mar 2012.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças da plantas cultivadas**. 4ed. V.2. Cap.31. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.385-391.

MAROTO-BORREGO, J. V. M. **Horticultura herbácea especial**. Madrid: Mundi-Prensa, 1995, 615p.

MATSUOKA, K.; CRUZ FILHO, J. da C.; MARTINS, M. C. P.; ANSANI, C. Brássicas: doenças causadas por fungos e bactérias. **Informe Agropecuário**, v.11(131), p.22-24, 1985.

MCCUE, P.; ZHENG, Z.; PINKHAM, J. L.; SHETTY, K. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, v.35, p.603-13, 2000.

METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: Current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.13-18, 2001.

MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O tomateiro**. Campinas: Fundação Cargil, 1989. 397p.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v.1962, p.491-498, 2002.

MOLINARI, S.; BASER, N. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. **Crop Protection**, v.29, p.1354-1362, 2010

MOREL, J.; DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. **Plant Cell Death and Differentiation**, v.4, p.671 ± 683, 1997.

MOTOYAMA, M. M.; SHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STARGALIN, J. R.; FIORI A. C. G.; SCAPIM C. A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.25, n.2, p.509-512, 2003.

NAIKA, S.; JEUDE, J. L.; GOFFAU, M.; van DAM, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v.1998, p.249-266, 2004.

ONSANDO, J. M. Black rot of crucifers. In: CHAUBE, H. S.; KUMAR, J.; MUKHOPADHYAY, A. N. **Plant diseases of international importance: diseases of vegetables and oil seed crops**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, v.2, p.243-252, 1992.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E. VÁZQUEZ-ODÉRIZ, L.; ARBONES-MACIÑEIRA, E.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. A. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. **Food Chemistry**, v.112, p.146–149, 2009.

PALLERONI, N. J.; HILDEBRAND, D. C.; SCHROTH, M. N.; HENDSON, M. Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars. **Journal of Applied Bacteriology** 75, p.441-446, 1993.

PANDEY, R.; MISHRA, A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.60, p.1356-1361, 2010.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**. v.1, p.417-453, 1995.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v.24, p.255-265, 2005.

PAZINATO, B. C.; GALHARDO, R. C. **Processamento artesanal do tomate**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1997. 30p.

PENTEADO, S. R. **Cultivo orgânico de tomate**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2004.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEM, B.W.M.; LEÓN-KLOOTERZIEL, K.; et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.13, p.277-295, 2005.

PILLAI, C. K. S.; WILLI, P.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v.34, p.641–678, 2009.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE JÚNIOR, R. P.; LOPES, C. A.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticulturae**, v.695, p.101-108, 2005.

RABEA, E. I. et al. In vitro assessment of N-(benzyl)chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. **European Polymer Journal**, v.45, p.237–245, 2009.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.429-441, 2002.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.123-130, 2003.

REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.3-37, 1999.

RICK, C. M. Fruit and pedicel characteristics derived from Galápagos tomato. **Economic Botany**, v.21, p.174-184, 1967.

RIDE, J.P. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. **Physiology Plant Pathology**, v.16, p.187-196, 1980.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, v.16, p.3426-3436, 2004.

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2ed. Viçosa: UFV, 2005. 417p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Metabólitos e Constituintes Bacterianos como Indutores de Resistência em Plantas a Patógeno. In: RODRIGUES, F. Á. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos. **Anais da III Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa (MG), 2007.

ROMEIRO, R. S.; RODRIGUES, F. A. **Indução de resistência em Plantas a Patógenos**. 1ed. v.1. Rio Branco (MG): Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2007. 340 p.

ROMEIRO, R. S.; KIMURA, O. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Phytopathology**, v.145, p.495-498, 1997.

ROVATTI, B.; BRENNAN, R. J. Experimental thermal burns. **Industrial Medicine and Surgery**, v.28, p.364–368, 1959.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: Pascholati, S. F. **Reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos**, v.1, p.27-28, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 303-312, 1993.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Impacto ambiental do fungicida metalaxil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006, 96p.

SILVA, I. T. **Imunogenicidade e especificidade sorológica do exopolissacarídeo capsula e lipopolissacarídeo da parede celular de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. 2003. 38p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Programa de pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2003.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. Produção mundial e nacional. In: SILVA, J. B. C. GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento Industrial**. Brasília: Comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. p.8-11.

SILVA, R. F.; CASALI, V. W. D. Botânica de algumas brássicas. In: **Cultura de brassicas**. Viçosa: UFV, 1981. 49p.

SILVA-LOBO, V. L.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha-bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.343-349, 2005.

SKADHAUGE, B.; THOMSEN, K.; VON WETTSTEIN, D. The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. **Hereditas**, v.126, p.147–160, 1997.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Capadinha (MA), v.1, n.1, p.9, 2007.

SOMSSICH, I. E.; HAHBROCK, K. Patogen defense in plants: a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v.3, p.86-90, 1998.

SNOGERUP, S.; GUSTAFSSON, M.; VON BOTHMER, R. Brassica sect. Brassica (Brassicaceae). I. Taxonomy and variation. **Willdenowia**, v.19, p.271-365, 1990.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 221-244.

STALL, R. E.; BEAULIEU, C.; EGEL, D. S.; HODGE, N. C.; LEITE, R. P.; MINSAVAGE, G. V.; et al. Two genetically diverse groups of

strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

International Rice Research Institute, v.44, p.47-53, 1994.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.11, p.16-21. 1999.

STATSOFT. **Electronic Statistics Textbook**. Tulsa, 2007. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>> Acesso em: 05 abr 2011.

STICHER, L.; MAUCH M., B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v.75, p.687-706, 1993.

SU, Y. T.; CHANG, H. L.; SHYUE, S. K.; HSU, S. L. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochemical Pharmacology**, v.70, p.229-241, 2005.

SURJUSHE, A.; VASANI, R.; SAPLE, D. *Aloe vera*: A short review. **Indian Journal of Dermatology**, v.53, n.4, p.163-166, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v.220, p.105-117, 2004.

THORDAL-CRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**, v.11, p.1187-1194, 1997.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; CANDEIAS, J. A. N.
Microbiologia. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

UZMA, S.; HASSAN; NASEEM, J. Antifungal activity of aloe vera gel against plant pathogenic fungi. **Pakistan journal of botany**, v.43(4), p.2231-2233, 2011.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R.
QUANT: A software plant disease severity assessment. In: **8 th International congress of plant pathology**, Christchurch, New Zealand, 2003, p.105.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". **Virology**, v.40, p.199-211, 1970.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753–765, 1997.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v.60, p.106-112, 1984.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; GILLIS, M.; MEW, T. W.; SCHROTH, M. N. et al;. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. **Int J Syst Bacteriology**, v.40, p.312-316, 1990.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; INTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v.18, p.779-783, 2000.

WAKSMAN, S. A. The *Actinomycetes*: **Isolation, identification, cultivation and reservation**. Baltimore, Williams e Wilkins Company, 1959, pp 17-28.

WEILAND, J. J.; GUYONNET, R. Study of chemical modifications and fungi degradation of thermally modified wood using DRIFT spectroscopy. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v.61, p.216–220, 2003.

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytotopharmaceuticals**. Stutgard: Medpharma Scientific Publishers, 2004. 704p.

WILLIAMS, P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, v.64(8), p.736-742, 1980.

YAFEI, C; YONG, Z.; XIAOMING, Z.; PENG, G.; HAILONG, A.; YUGUANG, D.; YINGRONG, H.; HUI, L.; YUHONG, Z. Functions of oligochitosan induced protein kinase in Tobacco mosaic virus resistance and pathogenesis related proteins in tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.724–731, 2009.

YAGI, A.; KABASH, A.; MIZUNO, K.; MOUSTAFA, S. M.; KHALIFA, T. I.; TSUJI, H. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. **Planta Medicinal**, v.69, p.269-271, 2003.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S. M.; KHALIFA, T. I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. **Planta Medicinal**, v.68, p.957-960, 2002.

YASSER, E. I. Activities of antioxidants enzymes in Salicylic acid treated tomato against *Xanthomonas vesicatoria*. **African Journal of Microbiology Research**, v.6(27), p.5678-5682, 2012.

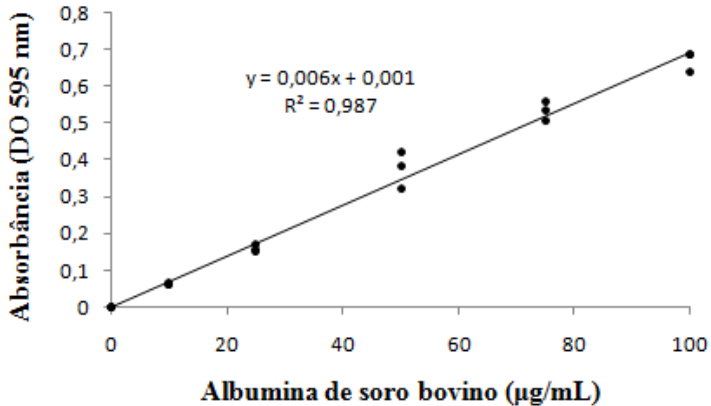
YIGIT, F. Acibenzolar-S-methyl induces lettuce resistance against *Xanthomonas campestris* pv. *Vitians*. **African Journal of Biotechnology**, v.10 (47), p.9606-9612, 2011.

YOUNG, J. M.; BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; FIRRAO, G., GARDAN, L., SADDLER, G. E., STEAD, D. E., TAKIKAWA, Y. Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria – A clarification. **Phytopathology**, v.91, p.617-620, 2001.

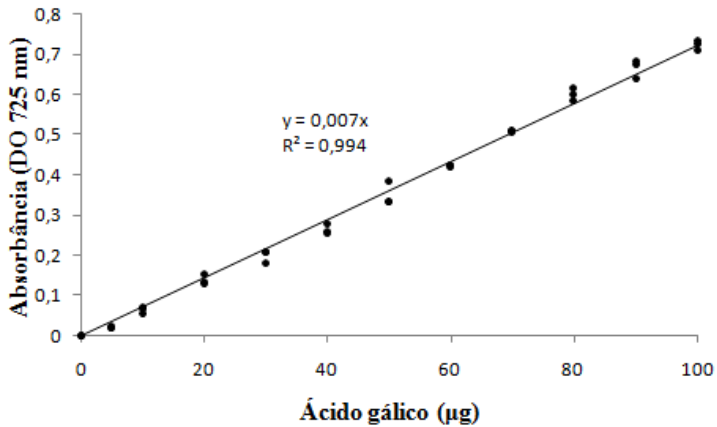
ZEIER, J. Age-dependent variations of local and systemic defense responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.66, p.30-39, 2005.

ANEXO

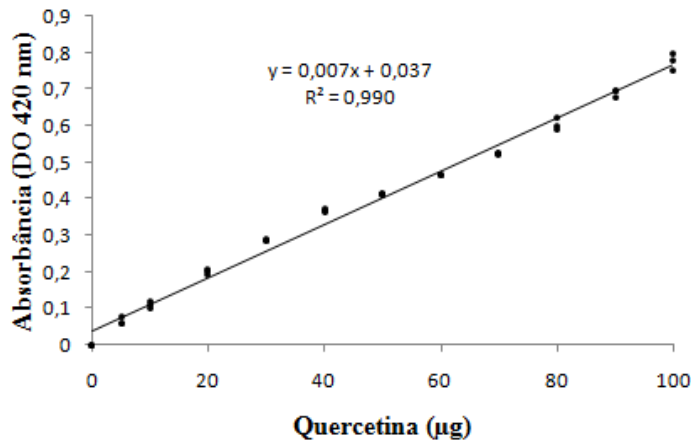
Anexo 1 – Curva padrão para dosagem de proteínas totais através do método Bradford



Anexo 2 - Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos pelo método Folin Ciocalteu.



Anexo 3 - Curva padrão para dosagem de flavonóides.



Anexo 4 – Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com concentrações de PB aos 4 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	547.417184	136.854296	81.055	0.0000
erro	20	33.768120	1.688406		
Total corrigido	24	581.185304			
CV (%) =	14.96				

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	3	127.199397	42.399799	51.361	0.0000
erro	20	16.510366	0.825518		
Total corrigido	23	143.709762			
CV (%) =	30.22				

Anexo 5 – Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com concentrações de GEL aos 4 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	41.252833	10.313208	0.907	0.4797
erro	19	216.050500	11.371079		
Total corrigido	23	257.303333			
CV (%) =	22.21				

Anexo 6- Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com concentrações de GOMA aos 4 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	461.508929	115.377232	41.856	0.0000
erro	16	44.104167	2.756510		
Total corrigido	20	505.613095			
CV (%) =	16.99				

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	3	125.773263	41.924421	76.804	0.0000
erro	22	12.008921	0.545860		
Total corrigido	25	137.782185			
CV (%) =	26.49				

Anexo 7 – Análise de variância da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate tratadas com concentrações de PX aos 4 dias antes da inoculação com *Xanthomonas gardneri*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	6	374.621744	62.436957	8.290	0.0000
erro	27	203.346680	7.531359		
Total corrigido	33	577.968424			
CV (%) =	29.15				

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	95.620760	23.905190	53.589	0.0000
erro	30	13.382629	0.446088		
Total corrigido	34	109.003389			
CV (%) =	19.28				

Anexo 8 – Análise de variância do intervalo de tempo (2, 4 e 6 dias) entre o tratamento de plantas de tomate e a inoculação com *X. gardneri*. Os dados foram transformados em raiz quadrada.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	22.469951	5.617488	80.116	0.0000
intervalo	3	24.735238	8.245079	117.591	0.0000
tratamento*intervalo	5	6.225857	1.245171	17.759	0.0000
erro	48	3.365610	0.070117		
Total corrigido	60	56.796657			
CV (%) =	12.53				

Anexo 9 – Análise de variância da reação de hipersensibilidade em células do mesofilo de plantas de tomate tratadas com água destilada, PB, GOMA ou PX.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	3	198243.608115	66081.202705	2840.383	0.0000
inoculação	1	2067.138761	2067.138761	88.852	0.0000
tratamento*inoculação	3	7279.142927	2426.380976	104.294	0.0000
erro	30	697.946695	23.264890		
Total corrigido	37	208287.836497			
CV (%) =	7.41				

Anexo 10 – Análise de variância do crescimento de *X. gardneri* em meio NA acrescido de água, PB, GOMA ou PX em diferentes concentrações. Os dados foram transformados em raiz quadrada.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	2	0.651550	0.325775	39.973	0.0000
dose	4	0.209556	0.052389	6.428	0.0002
tratamento*dose	8	0.231008	0.028876	3.543	0.0020
erro	60	0.488991	0.008150		
Total corrigido	74	1.581105			
CV (%) =	12.49				

Anexo 11 – Análise de variância do crescimento de *X. gardneri* em meio NA acrescido de PX em diferentes concentrações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	0.574744	0.143686	19.651	0.0000
erro	20	0.146240	0.007312		
Total corrigido	24	0.720984			
CV (%) =	23.16				

Anexo 12 – Análise de variância da atividade de peroxidases, em planta de tomate pulverizadas com água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM, após 6 dias do tratamento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	132.037906	33.009477	11.440	0.0000
erro	23	66.366590	2.885504		
Total corrigido	27	198.404496			
CV (%) =	26.60				

Anexo 13 – Análise de variância da atividade de polifenoloxidasas, em plantas de tomate pulverizadas com água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM, após 6 dias do tratamento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	0.083621	0.020905	6.938	0.0007
erro	25	0.075325	0.003013		
Total corrigido	29	0.158946			
CV (%) =	22.86				

Anexo 14 – Análise de variância do teor de flavonóides, em plantas de tomate pulverizadas com água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM, após 6 dias do tratamento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	34029.879864	8507.469966	155.754	0.0000
erro	20	1092.427320	54.621366		
Total corrigido	24	35122.307184			
CV (%) =	3.06				

Anexo 15 – Análise de variância da atividade de peroxidases em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamentos (água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM) e inoculação (*X. gardneri*). Os dados foram transformados em raiz quadrada.

Plantas não inoculadas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	5	7.122330	1.424466	25.337	0.0000
intervalo	2	0.522383	0.261192	4.646	0.0134
tratamento*intervalo	8	1.043633	0.130454	2.320	0.0311
erro	58	3.260824	0.056221		
Total corrigido	73	11.949170			
CV (%) =	21.51				

Plantas inoculadas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	3.475777	0.868944	15.555	0.0000
intervalo	2	0.014158	0.007079	0.127	0.8812
tratamento*intervalo	8	0.484237	0.060530	1.084	0.3883
erro	55	3.072354	0.055861		
Total corrigido	69	7.046526			
CV (%) =	16.29				

Anexo 16 – Análise de variância da atividade de polifenoloxidasas em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamentos (água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM) e inoculação (*X. gardneri*).

Plantas inoculadas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	0.112392	0.028098	5.558	0.0007
intervalo	2	0.021755	0.010878	2.152	0.1253
tratamento*intervalo	8	0.057124	0.007140	1.412	0.2104
erro	59	0.298295	0.005056		
Total corrigido	73	0.489566			
CV (%) =	20.13				

Anexo 17 - Análise de variância da atividade da FAL em plantas de tomate submetidas a diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 dias) entre tratamentos (água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM) e inoculação (*X. gardneri*).

Plantas inoculadas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	62.492277	15.623069	7.204	0.0001
intervalo	2	3.067093	1.533546	0.707	0.4986
tratamento*intervalo	8	25.030624	3.128828	1.443	0.2061
erro	44	95.419794	2.168632		
Total corrigido	58	186.009788			
CV (%) =	19.15				

Anexo 18 – Análise de variância da severidade da podridão negra em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de PB aos 4 dias antes da inoculação com *X. campestris* pv. *campestris*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	3	69.450200	23.150067	2.175	0.1308
erro	16	170.307080	10.644192		
Total corrigido	19	239.757280			
CV (%) =	28.81				

Anexo 19 – Análise de variância da severidade da podridão negra em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de GOMA aos 4 dias antes da inoculação com *X. campestris* pv. *campestris*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	2247.068000	561.767000	56.507	0.0000
erro	20	198.832000	9.941600		
Total corrigido	24	2445.900000			
CV (%) =	16.95				

Anexo 20 – Análise de variância da severidade da podridão negra em plantas de couve-flor tratadas com concentrações de PX aos 4 dias antes da inoculação com *X. campestris* pv. *campestris*. Os dados foram transformados em raiz quadrada.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	6	33.561095	5.593516	23.004	0.0000
erro	37	8.996852	0.243158		
Total corrigido	43	42.557946			
CV (%) =	20.23				

Anexo 21 – Análise de variância da severidade da podridão negra em plantas de couve-flor tratadas com diferentes polissacarídeos (PB, GOMA ou PX) aos 4 dias antes da inoculação com *X. campestris* pv. *campestris*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	3	1330.351997	443.450666	56.411	0.0000
erro	20	157.222199	7.861110		
Total corrigido	23	1487.574196			
CV (%) =	30.46				

Anexo 22 – Análise de variância do crescimento de *X. campestris* pv. *campestris* em meio NA acrescido de PX em diferentes concentrações.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	3	0.888586	0.296195	283.163	0.0000
erro	16	0.016736	0.001046		
Total corrigido	19	0.905323			
CV (%) =	16.40				

Anexo 23 - Análise de variância da atividade de peroxidases, em planta de couve-flor pulverizadas com água destilada, PB, GOMA, PX ou ASM, após 4 dias do tratamento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
tratamento	4	228.603357	57.150839	23.914	0.0000
erro	17	40.626775	2.389810		
Total corrigido	21	269.230132			
CV (%) =	21.31				